

Síntese de tripéptidos lipofílicos miméticos da prolina como potenciais neuroprotetores

Sara Raquel Alçada Bragança Ribeiro

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

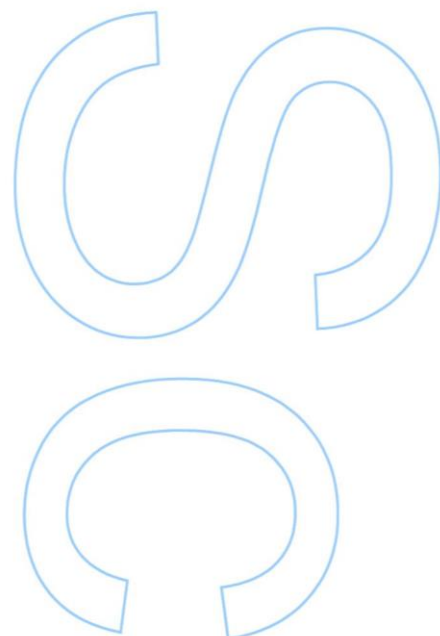
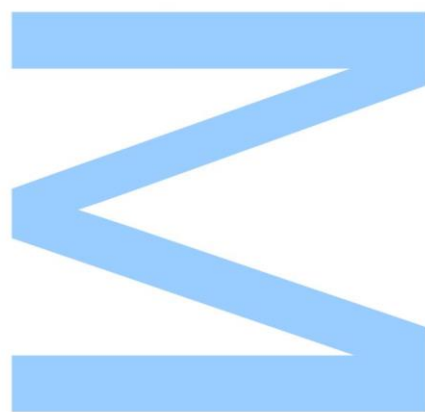
2016

Orientador

Prof. Dr. José Enrique Borges, Prof. Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Coorientador

Prof. Dr. Xerardo García Mera, Prof. Auxiliar, Facultad de Farmacia, Universidade
de Santiago de Compostela

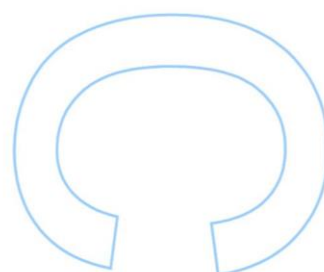
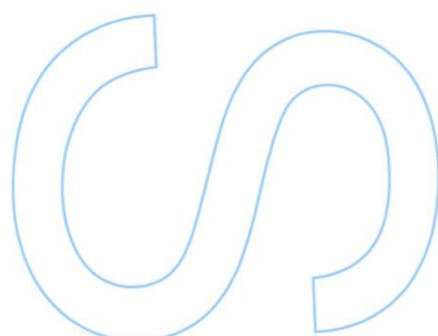
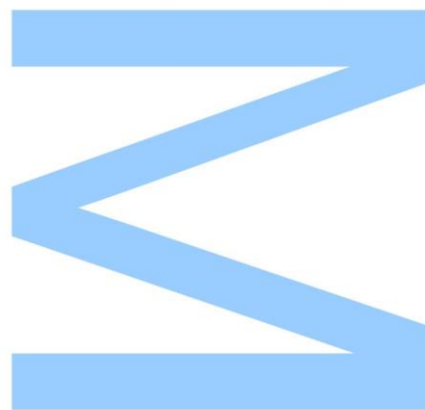




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor José Enrique Borges por me ter aceite e acolhido no seu grupo de investigação e pela sugestão de fazer ERASMUS em Santiago de Compostela, uma escolha da qual não me arrependo. Obrigada por todos os ensinamentos que adquiri no ramo da Química Orgânica, foi uma honra fazer parte da sua equipa de trabalho.

Ao Professor Doutor Xerardo García, o meu orientador de Santiago de Compostela, por me ter recebido tão bem no seu grupo de investigação e por tornar tão fácil a minha adaptação. Obrigada por toda a disponibilidade, ensinamentos e palavras amigas que recebi ao longo da minha estadia em Espanha, tudo o que aprendi foi muitíssimo importante para o meu desenvolvimento profissional e que vou levar comigo.

Ao Xosé por toda a ajuda que me deu que facilitou imenso o meu trabalho e a minha aprendizagem a todos os métodos que tinha de seguir para trabalhar com segurança no laboratório. Agradeço por toda a sua disponibilidade e dedicação.

Ao doutorando Ivo Dias por toda a ajuda e paciência que demonstrou ao longo do desenvolvimento da minha tese. Mesmo eu estando em Espanha nunca me senti desamparada e nunca recusou nenhuma ajuda ou explicação sempre que necessitei, o que acabou por facilitar o meu trabalho. Obrigada pela amizade e pela paciência e por tudo o que me ensinou relativamente á síntese peptídica. Agradeço por toda a preocupação que demonstrou para eu conseguir desenvolver com sucesso o objetivo delineado para a minha tese. Espero, sinceramente, que tenha sucesso e que a nossa amizade se mantenha.

À minha família, principalmente, aos meus pais e à minha irmã Rita Ribeiro por todo o apoio que me deram, por sempre apoiarem as minhas escolhas e por terem sempre uma palavra amiga. Obrigada aos meus pais pelo esforço que fizeram ao longo destes 5 anos e, principalmente, por este ultimo por conseguirem que eu fosse para Espanha. Obrigada Rita Ribeiro por não seres só minha irmã mas também minha amiga, minha confidente e o meu grande orgulho. Obrigada aos três por mesmo estarmos longe este ano terem estado sempre tão perto.

Aos meus amigos que se mantiveram comigo durante estes anos, principalmente à Mariana Silva que sempre foi um grande apoio desde que nos conhecemos há 12 anos. Obrigada por saber sempre o que dizer, por estar sempre tão presente, por ser das pessoas que mais confio e por nada mudar ao longo destes anos, esta amizade vai ser, sem dúvida, para a vida.

Às minhas grandes amigas que fiz nestes 5 anos de faculdade e que também vão ser para vida. Á Mariana Sousa por toda a amizade e preocupação que sempre

demostrou e por nunca me deixar desamparada, por facilmente me por a sorrir e que apesar da distância deste ano sentir que nada disso mudou. À Natália Magalhães por ser a primeira pessoa que conheci na faculdade e que embarcou comigo nesta aventura por Espanha, obrigada por todo o apoio que me deu, por nunca deixar que eu fosse abaixo e por todos os momentos que vivemos juntas. À Patrícia Silva por sempre me entender tão bem e por sempre ter palavras que me confortam. À Teresa Vaz por sempre mostrar que nada muda e que está sempre lá. Ao João Trigo por todos os momentos que tivemos e por tornar impossível estar triste e preocupada quando se está á beira dele. Ao Rui Cesar por ser um grande exemplo a seguir tanto a nível académico como pessoal e pela amizade e preocupação que sempre demonstrou.

Por último, mas não menos importante, a todas as pessoas que conheci em Santiago de Compostela, principalmente, ao Xião Loureiro por sempre se mostrar disponível, por todos os momentos que vivemos em Espanha e por todos os locais lindíssimos que nos mostrou e que nunca vou esquecer.

Resumo

A utilização de péptidos como potenciais fármacos é um campo importante da investigação. Nas últimas décadas, realizaram-se diversos estudos relativos à síntese de péptidos estruturalmente modificados para melhorar a estabilidade e a atividade biológica desses compostos. Nos últimos anos, moléculas heterocíclicas pequenas têm atraído uma atenção considerável e entre estes, as estruturas de derivados do aminoácido prolina constituem uma classe particularmente interessante de moléculas a serem estudadas.

O GPE e o PLG são dois tripéptidos que tem sido alvo de estudos devido às suas capacidades neuroprotetoras face a doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Tendo isto em conta, o objetivo deste trabalho foi a síntese de tripéptidos lipofílicos como potenciais análogos bioativos de PLG e GPE. Nestes análogos a prolina foi substituída pelo sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano e para aumentar a lipofilicidade adicionou-se uma cadeia gorda C12 por condensação do cloreto de lauroilo. Os resíduos dos aminoácidos N- e C-terminais também foram substituídos por aminoácidos estruturalmente semelhantes, de forma a ter uma síntese diversificada e poder-se, assim, explorar a química desses peptidomiméticos.

Adicionalmente, ainda foi possível se sintetizar derivados de GPE em que a prolina foi substituída pela 4-hidroxiprolina. Para manter a coerência deste trabalho adicionou-se também uma cadeia gorda mas neste caso foi de 6 carbonos e também se substituíram os resíduos dos aminoácidos. Estes tripéptidos tiveram uma rota de síntese distinta uma vez que se aplicou um novo método *one pot* desenvolvido pelo grupo de investigação que permitiu a síntese de tripéptidos através de uma única reação de acoplamento peptídico.

Relativamente aos derivados do GPE, como já foi referido, sintetizaram-se dois tipos de análogos. Sintetizaram-se com sucesso 4 análogos uma cadeia hidrocarbonada de 12C e com o sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano e outros 4 com uma cadeia de 6C usando a 4-hidroxiprolina onde os aminoácidos utilizados para ambos foram a glicina ou L-alanina e o L-glutamato ou o L-aspartato.

Também se conseguiu sintetizar com sucesso 4 análogos do PLG com o sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano e onde os aminoácidos utilizados foram a leucina ou vanila e a glicina ou alanina.

Desta forma obteve-se prolinomiméticos com maior caráter lipofílico o que pode facilitar a sua passagem pela membrana plasmática e assim ter uma maior afinidade com o seu local de ação.

A atividade neuroprotetora dos tripéptidos finais, vai ser avaliada por um grupo independente para estudar o grau de neuroprotecção destes compostos utilizando culturas neuronais expostas a condições de excitotoxicidade mediada por glutamato e o *stress* oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogénio. No caso dos derivados de PLG estes irão, adicionalmente, ser sujeitos a um estudo farmacológico de forma a investigar a sua potencial ação como moduladores dos recetores D₂ através de estudos de binding.

Abstract

The use of peptides as potential drugs is an important field of research. In recent decades, there are many researches about synthesis of peptides structurally modified to improve the stability and biological activity of such compounds. In recent years small heterocyclic molecules have attracted considerable attention and between these, proline-derived structures constitute a particularly interesting class of molecules.

The GPE and the PLG are two tripeptides which has been investigated due to its neuroprotective capabilities face of neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson's. Have this in mind, the objective of this work was synthesized lipophilic tripeptides as potential bioactive analogues of GPE and PLG. To do so we replaced the proline residue for 2-azanorbornane moiety and in order to increase lipophilicity we added fat chain 12C by condensation of lauroyl chloride with bicyclic prolinemimetic. The N- and C-termini amino acid residues were also substituted by structural related ones following a diversity-oriented synthesis and thus exploring the chemistry of these peptidomimetics.

Additionally, it was still possible to synthesize derivatives GPE wherein the proline has been replaced by hydroxyproline. To maintain the consistency of this work is also added one fatty chain, but in this case was 6 carbons and is also replaced amino acid residues. These tripeptides have a different synthesis route since it is developed a new method allowing coupling of the tripeptide synthesis by a single coupling reaction.

Relatively of the GPE derivatives, as was already say, was synthesized two types of analogues. Was synthesized with success 4 analogues with a hydrocarbon chain of 12C and the system 2-azabicyclo [2.2.1] heptane and other 4 with a chain of 6C using hidroxi proline and the aminoacids e outros 4 com uma cadeia de 6C usando a hidroxi prolina onde os aminoácidos used for both was glycine and alanine and glutamate or aspartate.

Also could synthesize 4 analogues of PLG with sucess with the system 2-azabicyclo[2.2.1]heptane and the aminoacids used were leucine or vaniline and glycine or alanine.

In this way, there was obtained prolinemimetics with bigger lipophilic character wich can facilitate its passage through the plasma membrane and have a greater affinity with their site of action.

The final compounds will be evaluated to assess their potential neuroprotective activity by an independent group to study the degree of neuroprotection of these compounds using neuronal cultures exposed to excitotoxicity conditions mediated by glutamate and oxidative stress induced by hydrogen peroxide. In the case of PLG these

derivatives will additionally be subjected to a pharmacological study to investigate their potential as modulators of action through D₂ receptor by binding studies.

Resumen

El uso de péptidos como potenciales fármacos es un importante campo de investigación en la actualidad. En las últimas décadas se han publicado muchos estudios sobre la síntesis de péptidos estructuralmente modificados para mejorar la estabilidad y la actividad biológica de dichos compuestos. En los últimos años las moléculas heterocíclicas pequeñas han atraído una atención considerable y entre estas, las estructuras derivadas de prolina constituyen una clase particularmente interesante de moléculas.

En este trabajo hemos sintetizado tripéptidos lipofílicos como potenciales análogos bioactivos de GPE y PLG. Para ello hemos reemplazado el residuo de prolina del resto 2-azanorbornano y con el fin de aumentar la lipofilia hemos añadido una cadena lipófila C12 por condensación de cloruro de lauroilo con el biciclo prolinomimético. Los residuos de los aminoácidos N- y C-terminales también fueron sustituidos por aminoácidos semejantes estructuralmente siguiendo una síntesis orientada a la diversidad y poder así explorar la química de estos peptidomiméticos.

Además aún fue posible sintetizar derivados de GPE en los que la prolina se ha sustituido por hidroxiprolina. Para mantener la coherencia de este trabajo hemos añadido una cadena lipófila, en este caso de 6 átomos de carbono y también hemos sustituido los residuos de aminoácidos. Estos tripéptidos se preparan mediante una ruta de síntesis diferente empleando un nuevo método *one pot* desarrollada por el grupo de investigación que permite la síntesis de tripéptidos en una sola reacción de acoplamiento.

Con respecto los derivados de GPE, como ya se ha mencionado, se sintetizaron dos tipos de análogos. Se sintetizaron con éxito 4 análogos con una cadena hidrocarbonada de 12C y el sistema-2-azabicyclo [2.2.1] heptano y otros 4 con una cadena con una cadena de 6C usando a hidroxiprolina donde se utilizaron los aminoácidos de glicina o alanina y glutamato o aspartato.

También se conseguía con éxito la síntesis de 4 análogos de PLG con el sistema de 2-azabicyclo [2.2.1] heptano y donde los aminoácidos utilizados fueron vainilla y leucina o glicina o alanina.

De este modo se obtuvieron prolinomiméticos con carácter más lipofílico que puede facilitar su paso a través de la membrana plasmática teniendo una mayor afinidad con su local de acción.

La actividad neuroprotectora de los compuestos finales preparados será evaluada por un grupo independiente para conocer el grado de neuroprotección de estos compuestos. Para ello se utilizarán cultivos neuronales expuestos a condiciones de

excitotoxicidad mediada por el glutamato y el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno. En el caso de los análogos de PLG, serán también sometidos a un estudio farmacológico para investigar su potencial como moduladores de la acción a través de estudios de binding al receptor D₂.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo.....	V
Abstract	VII
Resumen.....	IX
Índice	XI
Índice de esquemas	XVII
Índice de Figuras.....	XX
Índice de Tabelas	XXII
Abreviaturas	XXIII
Relação de compostos descritos.....	XXV
1. Introdução	1
1.1 Prolina	3
1.1.1 Prolinomiméticos	3
1.1.2 Prolinomiméticos e a síntese de fármacos.....	4
1.2 Introdução aos péptidos	6
1.2.1 Estrutura dos péptidos	7
1.2.1.1 Estrutura secundária dos péptidos	7
1.3 Síndromes Neurodegenerativas	9
1.3.1 Síndrome de Parkinson	11
1.3.1.1 Diagnóstico clínico	11
1.3.1.2 Tratamento.....	12
1.3.2 Alzheimer.....	17
1.3.2.1 Diagnóstico clínico	18
1.3.2.2 Causas e Tratamento.....	18
1.4 GPE como agente neuroprotetor	20
1.4.1 Atividade neuroprotetora do GPE	21
1.4.2 Análogos do GPE	22
1.5 PLG como agente neuroprotetor	25

1.5.1	PLG como modulador alostérico.....	25
1.5.2	Análogos de PLG.....	26
1.6	Âmbito da dissertação, objetivo e plano de trabalho	28
1.6.1	Âmbito da dissertação	28
1.6.2	Objetivo	28
1.6.3	Planos de trabalho.....	29
1.6.3.1	Derivados do GPE com 2-azanorbonano	29
1.6.3.2	Derivados de PLG com 2-azanorbonano.....	31
1.6.3.3	Derivados do GPE com 4-hidroxiprolina (Trabalho adicional).33	
2	Apresentação e Discussão de resultados	35
	Parte I: Síntese de 2-azabicyclo[2.2.1]heptano.....	36
2.1	Síntese do aminoéster 4.....	36
2.1.1	Reação de Diels-Alder	36
2.1.2	Resultados próprios.....	37
2.2	Síntese do aminoéster 5.....	39
2.2.1	Hidrogenação catalítica	39
2.2.2	Resultados próprios.....	40
2.3	Síntese do aminoéster 6 (2-azabicyclo[2.2.1]heptano)	41
2.3.1	Hidrogenólise.....	41
2.3.2	Resultados próprios.....	41
	Parte II: Síntese dos derivados de GPE usando 2-azanorbornano	43
2.4	Síntese dos aminoácidos gordos 9w,x.....	43
2.4.1	Reação de condensação	43
2.4.2	Resultados próprios.....	44
2.5	Síntese dos aminoácidos 10w,x	45
2.5.1	Hidrólise alcalina.....	45
2.5.2	Resultados próprios.....	46
2.6	Síntese dos dipéptidos 11w,x	49
2.6.1	Reações de acoplamento	49

2.6.2	Resultados próprios.....	51
2.7	Síntese dos dipéptidos 12w,y	53
2.8	Síntese dos tripéptidos 14a-d	54
2.9	Compostos finais: primeira família de derivados (15a-d)	56
	Parte II: Síntese dos derivados de PLG usando 2-azanorbornano.....	60
2.10	Síntese do aminoácido 21	60
2.11	Síntese do aminoácido 22	61
2.12	Síntese do dipéptido 24y	63
2.13	Síntese do dipéptido 25y	64
2.14	Síntese dos tripéptidos 26a e 26b.....	65
2.15	Síntese dos tripéptidos 26c e 26d.....	67
2.15.1	Desproteção do dipéptido 28	67
2.15.2	Desproteção do dipéptido 30	68
2.15.3	Reação de acoplamento para obter os tripéptidos 26c e 26d....	69
2.16	Compostos finais: segunda família (27a-d).....	71
2.16.1	Aminólise	71
2.16.2	Resultados próprios.....	72
	Parte III: Síntese dos derivados de GPE usando 4-hidroxiprolina (trabalho adicional).....	74
2.17	Síntese do aminoácido 18	74
2.17.1	Reação de O-acilação	74
2.17.2	Resultados próprios.....	75
2.18	Síntese dos tripéptidos 19a-d	76
2.18.1	Síntese de tripéptidos <i>one-pot</i>	76
2.18.2	Resultados próprios.....	77
2.18.3	Compostos finais: terceira família (20a-d).....	79
3	Conclusão	81
4	Procedimento Experimental.....	85
4.1	Aspetos gerais.....	86

4.2	Síntese de 2-azabicyclo[2.2.1]heptano	88
4.2.1	Síntese de (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-[(<i>R</i>)-1-feniletil]-2-azabicyclo[2.2.1]-heptano-3-carboxilato de etilo.....	88
4.2.2	Síntese de (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de etilo.....	91
4.3	Síntese dos derivados de GPE	94
4.3.1	Síntese de <i>N</i> -lauroilglicinato de metilo	94
4.3.2	Síntese de <i>N</i> -lauroilglicina	97
4.3.3	Síntese de (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carboxilato de etilo.....	100
4.3.4	Síntese do ácido (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carboxílico.....	103
4.3.5	Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-glutamato de dibenzilo	106
4.3.6	Síntese de ácido [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-glutâmico	110
4.3.7	Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-aspartato de dibenzilo	114
4.3.8	Síntese de ácido [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-aspártico	118
4.3.9	Síntese de <i>N</i> -lauroil-L-alaninato de metilo	122
4.3.10	Síntese de <i>N</i> -lauroil-L-alina	125
4.3.11	Síntese de (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carboxilato de etilo.....	128
4.3.12	Síntese de (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carboxilato de etilo.....	131
4.3.13	Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-glutamato de dibenzilo	134
4.3.14	Síntese de ácido [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-glutâmico	138
4.3.15	Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-aspartato de dibenzilo	142

4.3.16 Síntese de ácido [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>N</i> -lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-aspartico	146
4.3.17 Síntese de hexanoato de (4 <i>R</i>)-4-hidroxirolina	150
4.3.18 Síntese de Z-glicil-[(4 <i>R</i>)-4-hexanoiloxiprolil]-L-glutamato de dibenzilo.....	153
4.3.19 Síntese de ácido glicil-[(4 <i>R</i>)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-glutâmico.....	158
4.3.20 Síntese de Z-glicil-[(4 <i>R</i>)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-aspartato de dibenzilo.....	162
4.3.21 Síntese de ácido glicil-[(4 <i>R</i>)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-aspartico.....	167
4.3.22 Síntese de Z-L-alil-[(4 <i>R</i>)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-glutamato de dibenzilo.....	171
4.3.23 Síntese de ácido L-alil-[(4 <i>R</i>)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-glutâmico.....	175
4.3.24 Síntese de Z-L-alil-[(4 <i>R</i>)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-aspartato de dibenzilo.....	179
4.3.25 Síntese de ácido L-alil-[(4 <i>R</i>)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-aspartico.....	183
4.4 Síntese dos derivados de PLG	187
4.4.1 Síntese de (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carboxilato de etilo.....	187
4.4.2 Síntese de ácido (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carboxílico.....	190
4.4.3 Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucinato de metilo.....	193
4.4.4 Síntese [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucina.....	196
4.4.1 Síntese de de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucilglicina.....	199
4.4.2 Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucilglicinamida.....	203
4.4.3 Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucil-L-alaninato de metilo	207

4.4.4 Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucil-L-alaninamida	211
4.4.5 Síntese de L-valilglicinato de metilo	215
4.4.6 Síntese [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(lauroil)-2-azabicyclo-[2.2.1]heptane-3-carbonil]-L-valilglicinato de metilo	217
4.4.7 Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-valilglicinamida	221
4.4.8 Síntese de L-valil-L-alaninato de metilo	225
4.4.9 Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-valil-L-alaninato de metilo	228
4.4.10 Síntese de [(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-valil-L-alaninamida	232
Referências bibliográficas	236

Índice de esquemas

Esquema 1 - Representação da via de síntese dos derivados de GPE com cadeia de 12C contendo o prolinomimético 2-azanorbornano	30
Esquema 2 - Representação da via de síntese dos derivados de GPE com cadeia de 12C contendo o prolinomimético 2-azanorbornano	30
Esquema 3 - Representação da rota de síntese dos derivados de PLG com uma cadeia de 12C contendo o prolinomimético 2-azanorbornano	32
Esquema 4 - Representação da via de síntese dos derivados de GPE com cadeia de 6C usando a 4-hidroxi-prolina	33
Esquema 5 - Representação da reação de aquecimento da mistura de 1,3 -butadieno e eteno para se obter o ciclohexeno	36
Esquema 6 - Representação da reação de aza-Diels-Alder entre o glioxilato de etilo (1) e R-feniletilamina (3) e ciclopentadieno	37
Esquema 7 - Representação da reação de aza-Diels-Alder entre o glioxilato de etilo (1) e R-feniletilamina (3) e ciclopentadieno	37
Esquema 8 - Mecanismo de reação da cisão oxidativa para formar o glioxilato de etilo a partir do L-tartarato de dietilo	37
Esquema 9 - Mecanismo da reação heterogênea de Diels-Alder para obter uma mistura de diastereoisômeros onde está presente o aminoéster 4	38
Esquema 10 - Reação de hidrogenação do aminoéster 4 em meio ácido para obter o hidrocloreto 5.....	40
Esquema 11 - Reação de hidrogenação do aminoéster 4 em meio ácido para obter o hidrocloreto 5.....	40
Esquema 12 - Reação de hidrogenólise do aminoéster 5 para obter o sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano (6)	41
Esquema 13 - Mecanismo de reação de condensação entre um cloreto de acilo e uma amina para a formação de uma amida.....	43
Esquema 14 - Mecanismo de reação de condensação entre um cloreto de acilo e uma amina para a formação de uma amida.....	43
Esquema 15 - Reação de condensação entre o cloreto de lauroílo (7) e os aminoácidos 8w,x para obter os aminoácidos gordos 9w,x.....	44
Esquema 16 - Reação de condensação entre o cloreto de lauroílo (7) e os aminoácidos 8w,x para obter os aminoácidos gordos 9w,x.....	44
Esquema 17 - Mecanismo de reação de uma hidrólise alcalina para obtenção de um ácido carboxílico a partir de um éster	46

Esquema 18 - Mecanismo de reação de uma hidrólise alcalina para obtenção de um ácido carboxílico a partir de um éster	46
Esquema 19 - Reação de hidrólise alcalina dos aminoácidos gordos 9w,x para obter o respectivo ácido carboxílico (10w,x)	46
Esquema 20 - Mecanismo condensação peptídica usando TBTU como agente de acoplamento	50
Esquema 21 - Reação de acoplamento peptídico entre o biciclo 6 e os aminoácidos 10w,x	51
Esquema 22 - Reação de hidrólise alcalina dos dipéptidos 11w,y para obter o respectivo ácido carboxílico (12w,x)	51
Esquema 24 - Reação de hidrólise alcalina dos dipéptidos 11w,y para obter o respectivo ácido carboxílico (12w,x)	53
Esquema 25 - Reação de acoplamento peptídico entre os aminoácidos 13y,z e os dipéptidos 12w,x para obter os tripéptidos 14a-d	54
Esquema 26 - Reação de acoplamento peptídico entre os aminoácidos 13y,z e os dipéptidos 12w,x para obter os tripéptidos 14a-d	54
Esquema 27 - Reação de hidrogenólise dos tripéptidos 14a-d para obter os tripéptidos finais 15a-d	57
Esquema 28 - Reação de condensação entre o biciclo 6 e o cloreto de lauroílo (7) para obter o aminoácido 21	60
Esquema 29 - Reação de condensação entre o biciclo 6 e o cloreto de lauroílo (7) para obter o aminoácido 21	60
Esquema 30 - Reação de hidrólise alcalina do aminoácido 21 para obter o aminoácido 22	61
Esquema 31 - Reação de hidrólise alcalina do aminoácido 21 para obter o aminoácido 22	61
Esquema 32 - Reação de acoplamento peptídico entre o aminoácido 22 e o aminoácido 23y para obter o dipéptido 24y	63
Esquema 33 - Reação de acoplamento peptídico entre o aminoácido 22 e o aminoácido 23y para obter o dipéptido 24y	63
Esquema 34 - Reação de hidrólise alcalina do dipéptido 24y para obter o respectivo ácido carboxílico (25y)	64
Esquema 35 - Reação de hidrólise alcalina do dipéptido 24y para obter o respectivo ácido carboxílico (25y)	64
Esquema 36 - Reação de acoplamento peptídico entre o dipéptido 25y e os aminoácidos 8w,x para obter os tripéptidos 26a e 26b	65

Esquema 37 - Reação de acoplamento peptídico entre o aminoácido 6 e os dipéptidos 29 e 31 para obter os tripéptidos 26b e 26d	65
Esquema 39 - Reação de acoplamento peptídico entre o aminoácido 6 e os dipéptidos 29 e 31 para obter os tripéptidos 26b e 26d	67
Esquema 40 - Mecanismo reacional da desproteção ácida do grupo protetor terc-butoxicarbonilo.....	67
Esquema 41 - Mecanismo reacional da desproteção ácida do grupo protetor terc-butoxicarbonilo.....	67
Esquema 42 - Reação de desproteção do dipéptido 28 para a obtenção do dipéptido 29	68
Esquema 43 - Reação de hidrogenólise do dipéptido 30 para obter o dipéptido 31 ...	68
Esquema 44 - Reação de hidrogenólise do dipéptido 30 para obter o dipéptido 31 ...	68
Esquema 45 - Mecanismo reacional de obtenção de uma amida primária usando corrente de amoníaco em metanol.....	71
Esquema 46 - Mecanismo reacional de obtenção de uma amida primária usando corrente de amoníaco em metanol.....	71
Esquema 47 - Reação de aminólise dos tripéptidos 26a-d para obter os tripéptidos 27a-d	72
Esquema 48 - Mecanismo reacional da reação de O-acilação de forma a obter um éster	75
Esquema 49 - Reação de O-acilação entre 4-hidroxiprolina (16) e o cloreto de hexanoílo (17) para obter o aminoácido 18	75
Esquema 50 - Reação de O-acilação entre 4-hidroxiprolina (16) e o cloreto de hexanoílo (17) para obter o aminoácido 18	75
Esquema 51 - Mecanismo da reação de acoplamento para a síntese de tripéptidos one pot	76
Esquema 52 - Mecanismo da reação de acoplamento para a síntese de tripéptidos one pot	76
Esquema 53 - Reação de acoplamento one-pot para obter os tripéptidos 19a-d	77
Esquema 54 - Reação de hidrogenólise dos tripéptidos 19a-d para obter 20a-d	79

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do α -aminoácido L-Prolina.....	3
Figura 2 - Estrutura química dos fármacos boceprevir e telaprevir	5
Figura 3 - Estrutura química da ribavirina	5
Figura 4 – Estrutura química dos neuropéptidos GPE e PLG	6
Figura 5 - Hierarquia estrutural das cadeias peptídicas ¹	7
Figura 6 - Representação de uma hélice- α ¹	8
Figura 7 - Representação de uma folha- β (a), uma folha- β antiparalela (b) e uma folha- β paralela (c) ¹	9
Figura 8 - Estrutura química do glutamato	10
Figura 9 - Estrutura química dos neurotransmissores acetilcolina e dopamina	11
Figura 10 - Representação da biossíntese da dopamina a partir da L-tirosina	12
Figura 11 - Representação do metabolismo da dopamina	13
Figura 12 - Estrutura química dos inibidores reversíveis da DDC carbidopa e benserazida	14
Figura 13 - Estrutura química dos agonistas dopaminérgicos bromocriptina , pergolida , carbergolina , lisurida , ropinirol e pramipexol	15
Figura 14 - Estrutura química dos inibidores da MAO-B selegilina e rasagilina	16
Figura 15 - Estrutura química dos inibidores de COMT de entocapona e tolcapona 17	
Figura 16 - Estrutura química de donepezilo , rivastigmina e galantamina	19
Figura 17 - Estruturas químicas dos análogos de GPE desenvolvidos até ao momento	24
Figura 18 - Estruturas químicas dos análogos de PLG desenvolvidos	27
Figura 19 – Espectro de ¹ H-RMN do aminoácido gordo 9w , em cima, com expansão do singlete correspondente ao grupo éster metílico e do espectro de ¹ H-RMN do aminoácido gordo 10w com expansão do grupo OH do ácido carboxílico	48
Figura 20 - Representação do espectro de ¹ H-RMN do tripéptido 14a com ampliação da zona aromática	56
Figura 21 - Espectro de ¹ H-RMN do tripéptido 15a com ampliação da zona do grupo do OH do correspondente ácido carboxílico.....	59

Figura 22 - Espectro do aminoácido **28** com ampliação da zona do grupo OH correspondente ao ácido carboxílico

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resultados obtidos para a síntese dos aminoácidos gordos 9w,x	44
Tabela 2 - Resultados obtidos para a síntese dos aminoácidos 10w,x	47
Tabela 3 - Resultados obtidos para os dipéptidos 11w,x derivados do GPE	51
Tabela 4 - Resultados obtidos para os dipéptidos 12w,x	53
Tabela 5 - Resultados obtidos para os tripéptidos protegidos 14a-d derivados do GPE	55
Tabela 6 - Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos finais derivados do GPE	57
Tabela 7 - Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos 26a e 26b derivados de PLG	65
Tabela 8 – Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos protegidos 26c e 26d ..	69
Tabela 9 – Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos finais 27a-d derivados do PLG	72
Tabela 10 - Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos protegidos 19a-d	77
Tabela 11 - Resultados para dos obtidos para a síntese dos tripéptidos finais 20a-d ..	79

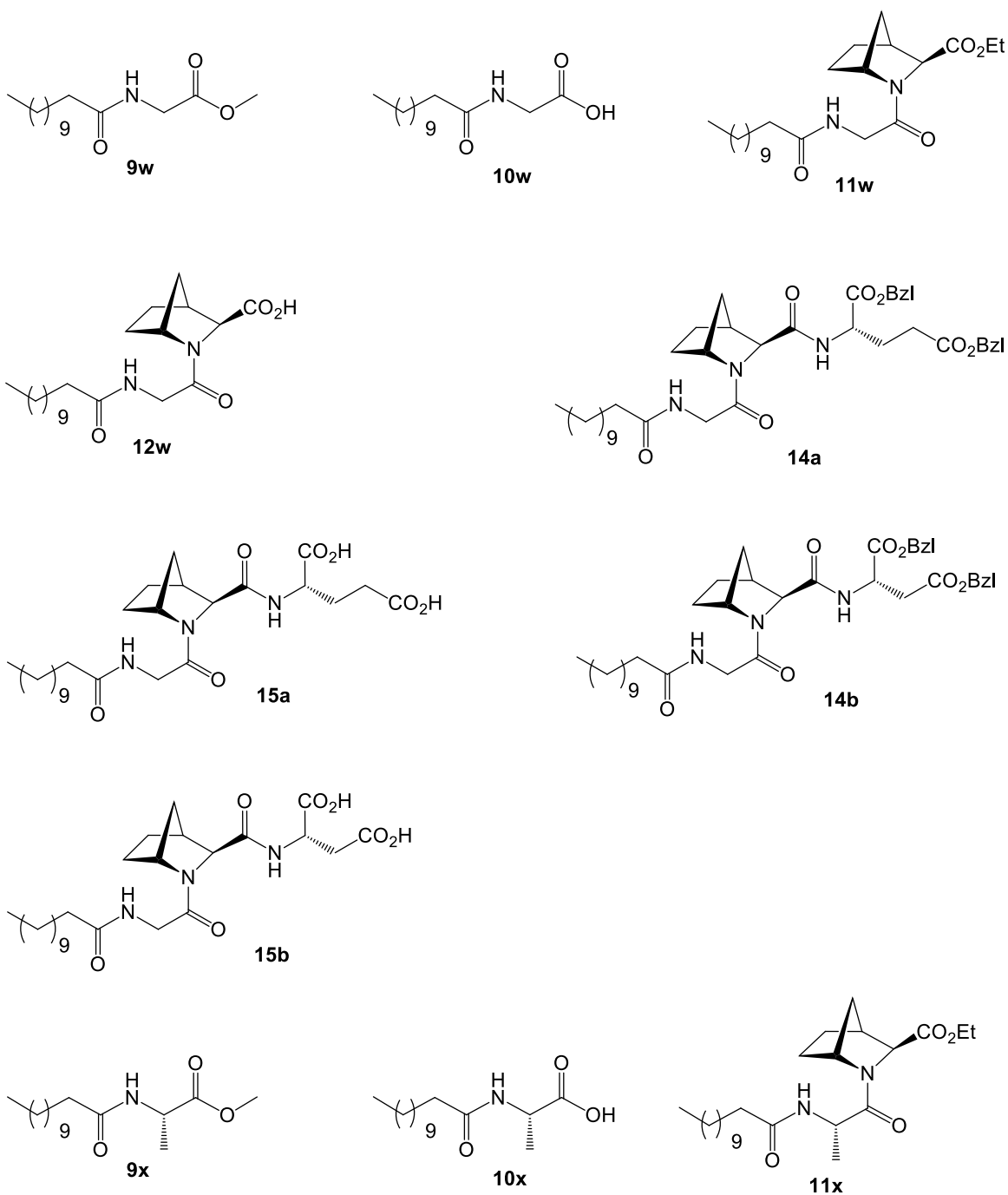
Abreviaturas

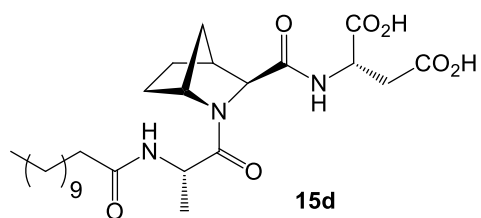
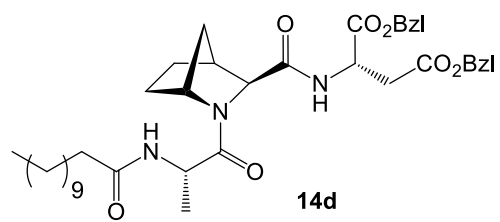
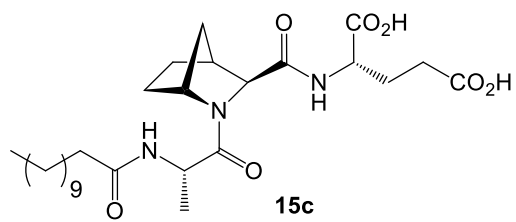
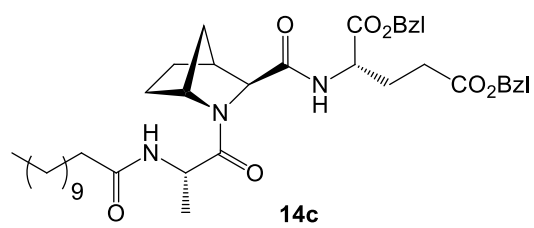
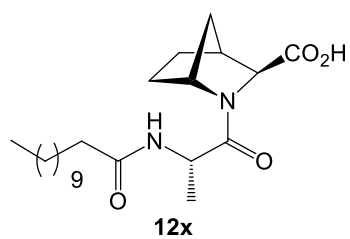
6-OHDA	6-hidroxidopamina
iPrOH	isopropanol
AC	Adenilato ciclase
AcOEt	Acetato de Etilo
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido 2-desoxirribo-nucleico
Ala	Alanina
ATP	Trifosfato de Adenosina
Asp	Aspartato
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
CC	Cromatografia em coluna
CCF	Cromatografia de camada fina
CPD	Ciclopentadieno
COMT	catecol- <i>O</i> -metiltransferase
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DA	Dopamina
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMC	Diclorometano
DIEA	<i>N</i> -etil- <i>N,N</i> -disopropilamina
DOPAC	ácido 3,4-di-hidroxifenilacetico
DOPAL	3,4-dihidroxifenilacetaldeido
Et₂O	Éter etílico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GPE	Ácido glicil-L-propil-L-glutâmico
Hex	Hexano
HMQC	<i>Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i>
MAO	Monoamina oxidase
MeOH	Metanol
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NMDA	<i>N</i> -metil-D-Aspartato
OBz	Benzoilo
PAOPA	Pirrolidinilcarbonilamino-2-oxopirrolidinacetamida

Pd/C	Paládio em carbono
p.f.	Ponto de fusão
PLG	L-propil-L-leucil-glicinamida
Pro	Prolina
R_f	Fator de retenção
RMN	Ressonancia Magnética Nuclear
SA	Síndrome de Alzheimer
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TBTU	Tetrafluorborato de O-benzotriazoliltetrametilurónio
TFA	Ácido trifluoracético
THB	tetra-hidrobiopterina

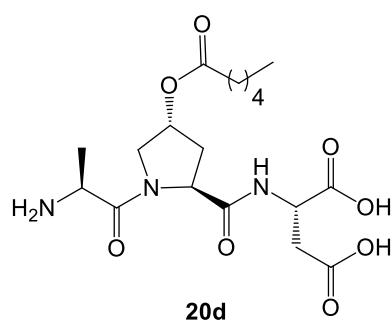
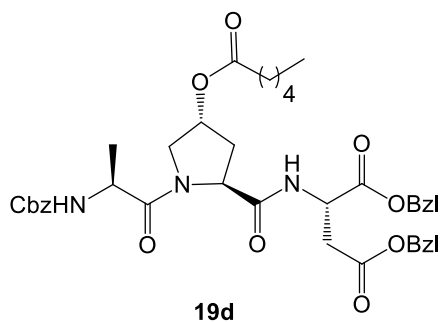
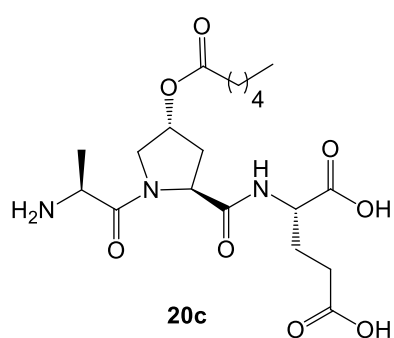
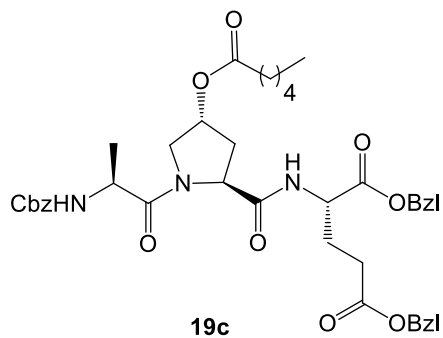
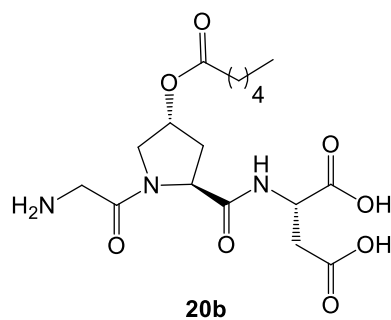
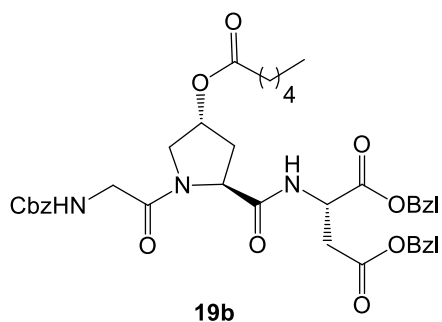
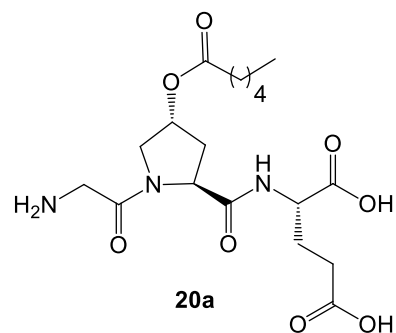
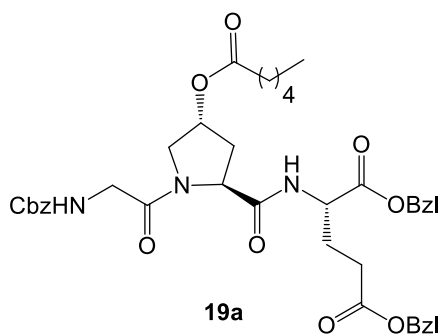
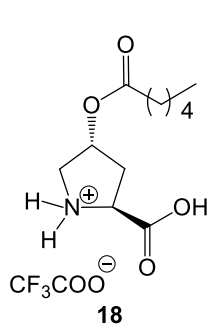
Relação de compostos descritos

Derivados de GPE e seus precursores com o prolinomimético 2-azabicyclo[2.2.1]-heptano

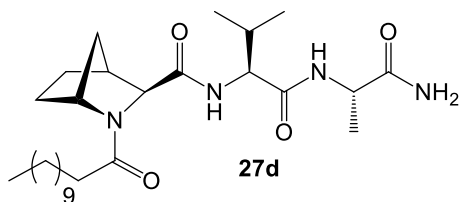
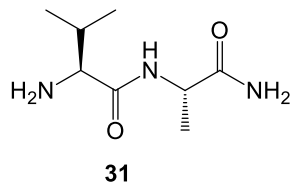
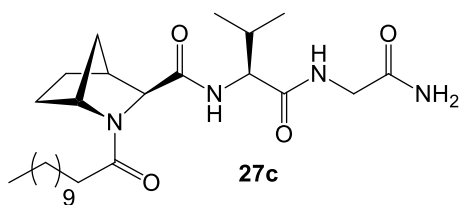
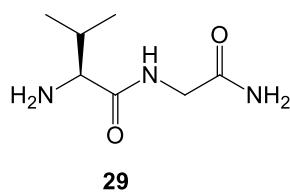
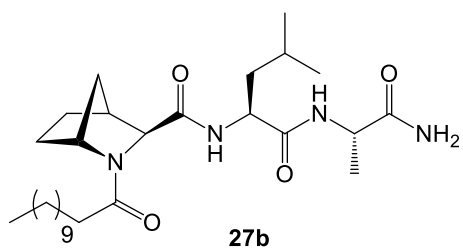
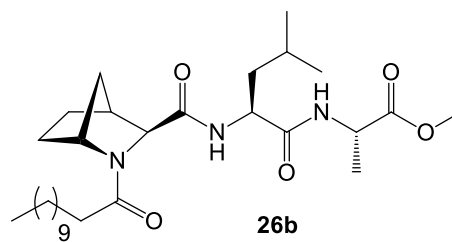
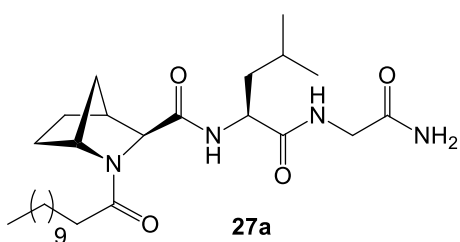
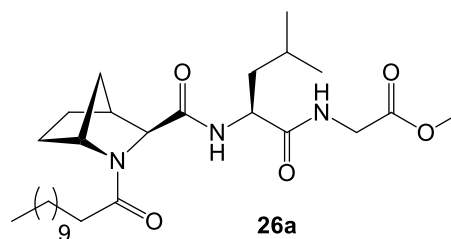
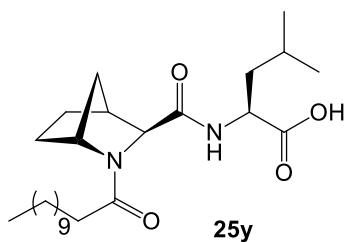
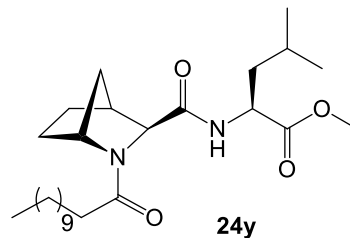
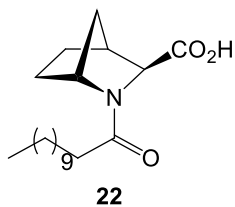
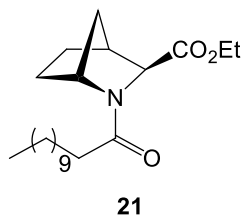




Derivados do GPE com 4-hidroxiprolina e seus precursores



Derivados do PLG com o prolinomimético 2-azabicyclo[2.2.1]-heptano e seus precursores



1.Introdução

1.1 Prolina

O α -aminoácido L-prolina (Pro ou P) é um dos vinte aminoácidos codificados pelo ácido 2-desoxirribonucleico (ADN). A sua forma mais comum, L, possui uma configuração estereoquímica *S* assim como os restantes α -aminoácidos, com exceção da cisteína e os seus derivados. É o único aminoácido natural cíclico e difere dos restantes pois a sua cadeia lateral está ligada tanto ao carbono α como ao átomo de azoto sendo por isso uma amina secundária e a sua estrutura está representada na Figura 1.^{1,2}

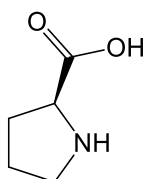


Figura 1 - Estrutura química do α -aminoácido L-Prolina

O aminoácido prolina influencia a arquitetura de uma proteína porque a estrutura cíclica torna a sua conformação mais restrita do que os restantes aminoácidos pois reduz a flexibilidade estrutural das regiões polipeptídicas que o contêm. A maioria das ligações peptídicas nas proteínas são *trans* mas no caso de conter o aminoácido prolina estas são, normalmente, *cis*. Isto deve-se ao facto do átomo de azoto da prolina estar ligado a dois átomos de carbono tetraédricos limitando as diferenças estereoquímicas entre *cis* e *trans*, no entanto a conformação *cis* acaba por ser favorecida.² Desta forma, uma característica das moléculas contendo o resíduo L-prolina, é a capacidade de formação de ligações peptídicas *cis* e a possibilidade de ocorrer isomerização (*cis-trans*) facilmente devido à diferença mínima na barreira energética. Estas propriedades torna este α -aminoácido com uma enorme importância na síntese de péptidos e proteínas.

1.1.1 Prolinomiméticos

Peptidomiméticos correspondem a uma classe de compostos que contêm unidades que mimetizam um ou mais α -aminoácidos numa cadeia peptídica. No caso dos *prolinomiméticos*, estes representam uma importante subclasse de *peptidomiméticos* em que o α -aminoácido mimetizado é a L-prolina e sendo dessa forma, designados como *compostos prolinomiméticos*, pseudoprolinas ou ψ Pro.³

Os *peptidomiméticos* devem ter a capacidade de se ligar aos alvos naturais da mesma forma das sequências naturais e, portanto, devem produzir os mesmos efeitos

biológicos mas é possível que estes apresentem propriedades melhoradas como uma maior seletividade e biodisponibilidade.⁴ Tendo isto em consideração, a designação de *compostos prolinomiméticos* torna necessário a síntese de unidades miméticas da prolina e o seu uso para produzir novos compostos que mimetizem o produto natural e, ainda, é necessário o estudo das propriedades físico-químicas e biológicas destes compostos.

O desenvolvimento de estruturas prolinomiméticas tem vindo aumentar com o principal objetivo de se obter novos agentes terapêuticos. É possível se verificar este interesse na síntese de prolinomiméticos pelo elevado número de patentes registadas por grandes companhias farmacêuticas e institutos de investigação nesta área.

As estruturas químicas dos compostos prolinomiméticos são vastas e diversificadas, desde a introdução de modificações no anel de pirrolidina, substituindo-se um átomo de carbono por um heteroátomo obtendo-se derivados de oxazolidinas⁵, tiazolidinas^{6,7}, pirazolidinas⁸ e imidazolidinas⁹, até á síntese de análogos com grupos substituintes no anel de pirrolidina nas diferentes posições.

Nestes últimos, encontram-se amplamente descritos os derivados 2-monossustituídos¹⁰, 3-monossustituídos^{11,12,13}, 4-monossustituídos^{14,15}, 5-monossustituídos, os 2,3-dissustituídos^{16,17}, 2,4-dissustituídos^{10,15}, 3,4-dissustituídos e, pelo nosso grupo de investigação, derivados 3,5-dissustituídos¹⁸. Também estão descritos alguns casos de derivados 2,3,4-trissustituídos¹⁹, 2,4,5-trissustituídos¹⁵ e 3,4,5-trissustituídos¹³. A par destas modificações também têm sido descritos prolinomiméticos em que o anel pirrolidínico é substituído por sistemas bicíclicos.²⁰

1.1.2 Prolinomiméticos e a síntese de fármacos

Existe muitos compostos com importância biológica que apresentam na sua estrutura química pelo menos um α -aminoácido cíclico. Estes apresentam uma elevada importância para a síntese de potências fármacos para diversas atividades biológicas e a L-prolina é o α -aminoácido que mais se destaca.

Os fármacos **boceprevir** e o **telaprevir** (Figura 2) são dois exemplos de fármacos com atividade antiviral que apresentam uma estrutura prolinomimética.

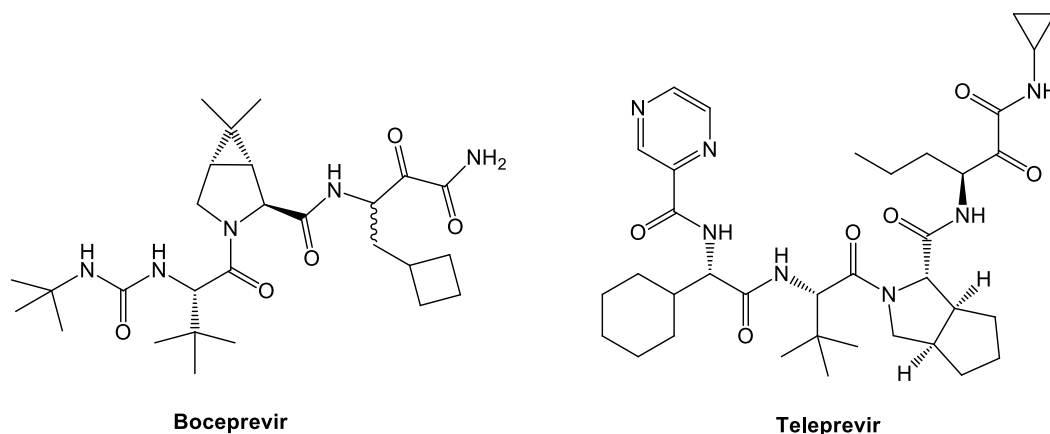


Figura 2 - Estrutura química dos fármacos **boceprevir** e **telaprevir**

Estes foram aprovados pela FDA em 2011 para serem administrados juntamente com a **ribavirina** (Figura 3) e interferirem no tratamento da hepatite C crónica, que até agosto de 2011 eram as únicas opções comerciais para o seu tratamento.²¹ Tanto o boceprevir como o telaprevir são inibidores da protease NS3/4A. A protease NS3 é uma enzima que catalisa a transformação de proteínas importantes para a replicação viral. NS4A é um cofactor que funciona com NS3 para acelerar este processo. Portanto estes dois fármacos inibem diretamente este complexo enzima/cofactor e, por conseguinte, são capazes de reduzir a replicação viral.²²

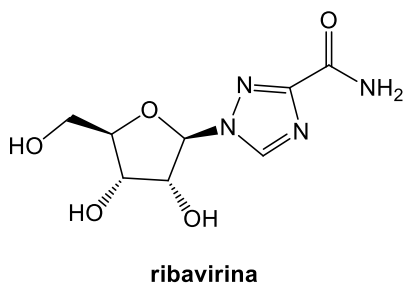


Figura 3 - Estrutura química da **ribavirina**

A estrutura prolinomimética de ambos os fármacos possuem restrição parcial dos seus graus de liberdade. Muitas investigações tem sido realizadas com o objetivo de encontrar alternativas para os fármacos mencionados anteriormente.

Os peptidomiméticos contendo compostos prolinomiméticos também mostram interesse noutra área terapêutica, como é o caso dos neuropéptidos **GPE (ácido glicil-L-propilglutâmico)** e **PLG (L-propil-L-leucilglicinamida)**. A estrutura química destes tripéptidos está representada na Figura 4. Estes possuem atividade biológica neuroprotetora mostrando uma elevada importância para diversas patologias neurodegenerativas como é o caso das síndromes de Huntington, Parkinson e Alzheimer.

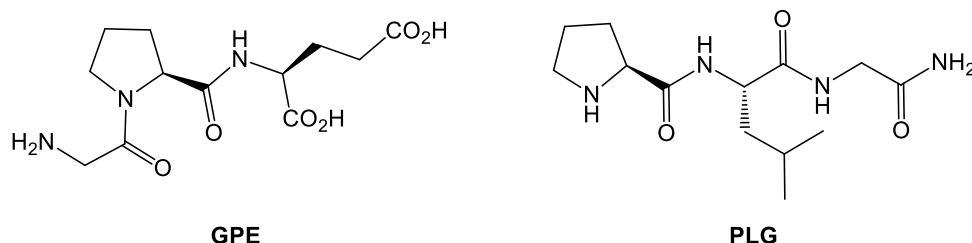


Figura 4 – Estrutura química dos neuropéptidos **GPE** e **PLG**

Devido às suas propriedades neuroprotetoras estes tripéptidos têm sido alvo de diversas pesquisas e tem sido explorado diversos análogos dos mesmos, com o principal objetivo de melhorar a sua atividade biológica para serem utilizados nas patologias neurodegenerativas referidas anteriormente.

As diversas modificações que têm sido realizadas incluem elementos de restrição em diferentes posições dos tripéptidos o que leva, muitas vezes, a modificações nos restantes resíduos de α -aminoácidos.

Alternativamente, verifica-se o uso de prolinomiméticos na síntese de novos aza ou isoazanucleósidos^{23,24}, cujas moléculas apresentam possíveis atividades anticancerígenas, antimaláricas e/ou antivirais.

1.2 Introdução aos péptidos

Vários estudos realizados ao longo dos anos têm demonstrado que pequenos péptidos têm um papel muito importante em diversos processos fisiológicos, daí este tipo de moléculas ter um elevado interesse no desenvolvimento de novos fármacos.²⁵

A utilização de péptidos como potenciais fármacos é um enorme campo de investigação, apesar da sua baixa estabilidade metabólica e da pobre absorção que estes compostos normalmente apresentam.²⁶ Isto deve-se ao facto das ligações amida serem o que dificulta a sua administração por via oral e porque os péptidos, geralmente, são dificilmente transportados através das membranas celulares e são rapidamente excretados pelo fígado e rins. Os péptidos possuem ainda uma elevada flexibilidade o que acaba por condicionar a seletividade face a recetores.

Contudo os péptidos endógenos fazem parte de diversos processos biológicos podendo atuar de forma seletiva como neurotransmissores, neuromoduladores, hormonas, entre outros. Depois de concluída a sua função estes sofrem mecanismos de degradação enzimática, não havendo acumulação no organismo evitando problemas de toxicidade.

Como é o caso do tripéptido ácido glicil-L-propril-L-glutâmico (GPE) que se origina através da clivagem do *N*-terminal do fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-

1), também conhecido como gliptomato; o tripéptido L-propil-L-leucilglicinamida, também designado por melanostatina ou fator de inibição da libertação da hormona estimuladora de melanócitos (MIF-1).

1.2.1 Estrutura dos péptidos

Existe uma hierarquia estrutural nas proteínas e existem três possíveis estruturas, a estrutura primária, a estrutura secundária e a estrutura terciária, representadas na Figura 5.

A estrutura primária refere-se à sequência de aminoácidos da cadeia peptídica. O modo de enrolamento das cadeias polipeptídicas induzidas pelo arranjo espacial dos aminoácidos vizinhos são causadas pelas pontes de hidrogénio intramoleculares e outras interações não covalentes originando a estrutura secundária. Neste tipo de estrutura é possível formarem-se dois diferentes arranjos a folha- β e a hélice- α .¹⁻²

Por fim, o empacotamento de um ou mais elementos da estrutura secundária origina unidades com um nível de organização superior formando-se assim a estrutura terciária. Várias são as forças que estabilizam este tipo de estrutura, como pontes de dissulfureto, pontes de hidrogénio, forças de London e interações eletrostáticas. Existem, ainda, efeitos que permitem que algumas proteínas assumam ainda um quarto nível estrutural: a estrutura quaternária que resulta da interação de unidades independentes, como é o caso da hemoglobina.¹⁻²

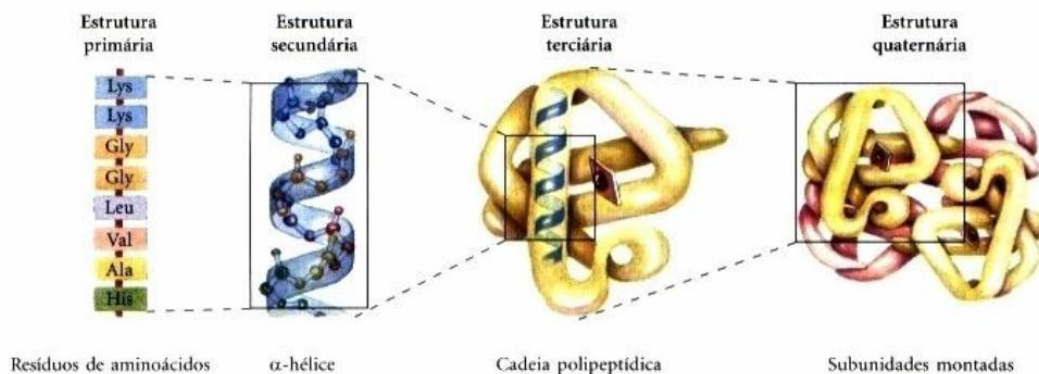


Figura 5 - Hierarquia estrutural das cadeias peptídicas¹

1.2.1.1 Estrutura secundária dos péptidos

O arranjo mais simples que uma cadeia polipeptídica poderia assumir com as suas ligações peptídicas rígidas é uma estrutura helicoidal designada por hélice- α , representada na Figura 6. Nesta estrutura o esqueleto polipeptídico está enrolado ao longo do maior eixo da molécula e as cadeias laterais dos resíduos dos α -aminoácidos estão projetados para fora do esqueleto helicoidal. Esta estrutura é estabilizada por uma

ponte de hidrogénio entre o grupo CON-H de um α -aminoácido e o grupo carbonilo do quarto α -aminoácido. Dentro da hélice- α , cada ligação peptídica (exceto aquelas perto da extremidade da hélice) participa nestas pontes de hidrogénio e todas elas combinados formam uma estrutura helicoidal considerável estável.¹⁻²

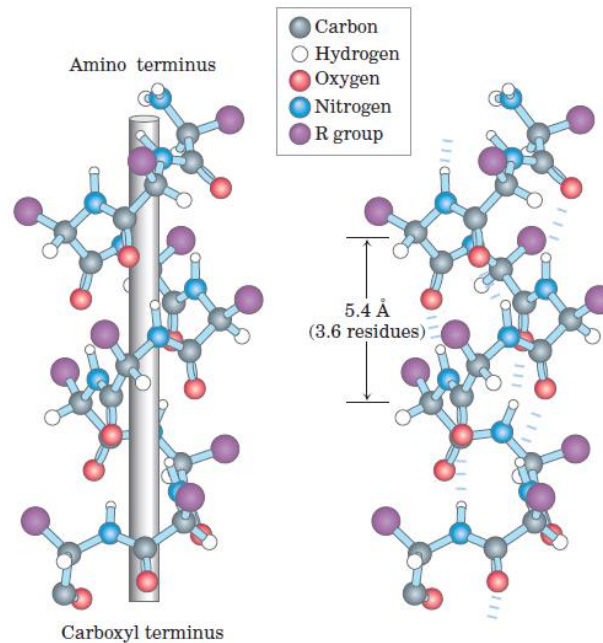


Figura 6- Representação de uma hélice- α ¹

Uma segunda conformação é a folha- β e nesta o esqueleto da cadeia polipeptídica é estendida em zig-zag em vez de uma hélice e as cadeias polipeptídicas são dispostas lado a lado. Nesta conformação formam-se pontes de hidrogénio entre segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica. As cadeias adjacentes podem se projetar para direções opostas (folha- β antiparalela) ou para direções iguais (folha- β paralelas), como está representada na Figura 7. No arranjo antiparalelo, o grupo NH e o grupo CO de cada aminoácido estabelecem pontes de hidrogénio com o grupo CO e o grupo NH, respetivamente, de um aminoácido da cadeia adjacente. No arranjo paralelo o esquema das pontes de hidrogénio estabelecidas é mais complicado. Para cada aminoácido o grupo NH estabelece pontes de hidrogénio com o grupo CO de um aminoácido da cadeia adjacente mas o grupo CO estabelece uma ponte de hidrogénio com o grupo NH do segundo aminoácido que se encontra na cadeia.¹⁻²

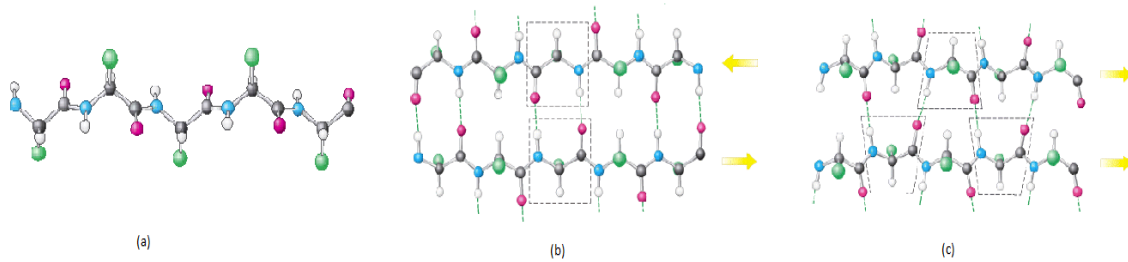


Figura 7 - Representação de uma folha- β (a), uma folha- β antiparalela (b) e uma folha- β paralela (c) ¹

1.3 Síndromes Neurodegenerativas

O sistema nervoso humano é talvez o sistema mais complexo de um organismo. Este sistema é dividido pelo Sistema Nervoso Central (SNC) e pelo Sistema Nervoso Periférico (SNP). O primeiro é constituído pelo encéfalo e pela espinal medula e este tem como principal objetivo integrar e processar a informação enviada pelos nervos. O segundo é formado pelos nervos e por pequenos agregados de células nervosas designadas por gânglios nervosos.²⁷

O sistema nervoso é constituído por dois tipos de células, os neurónios e as células que sustentam os neurónios designadas por células da glia. Os neurónios são as unidades estruturais e funcionais bases do sistema nervoso. Estes tem capacidade para responder a estímulos químicos e físicos, conduzir sinais eletroquímicos e libertarem substâncias químicas que regulam diversos processos do organismo. Os neurónios podem assumir diversas formas e tamanhos no entanto, geralmente, possuem quatro constituintes comuns, as dendrites, o corpo celular, o axónio e ramificações.²⁷

Os neurónios têm a capacidade de responder a alterações do meio em que se encontram (estímulos) com modificações da diferença de potencial elétrico que existe entre as superfícies interna e externa da membrana celular. Os neurónios reagem aos estímulos através da modificação de potencial elétrico e este pode restringir-se ao local do estímulo ou propagar-se. Quando há propagação do potencial elétrico dá-se o impulso nervoso, cuja função é transmitir a informação para outros neurónios, a músculos e a glândulas.²⁷

As principais funções do sistema nervoso são transmitir, analisar e utilizar as informações geradas por estímulos como pelo calor, luz, energia mecânica e modificações químicas do ambiente interno e externo. Além disso, o sistema nervoso também está presente na organização e coordenação, direta ou indiretamente, do funcionamento da maioria das funções do organismo (motoras, viscerais, endócrinas e psíquicas).²⁷

A transmissão do impulso nervoso entre dois neurónios é um processo designado por sinapse. Um impulso percorre todo comprimento do axónio até atingir a extremidade mais distante, chamado terminal sináptico, por sucessivas despolarizações e repolarizações da membrana. No terminal sináptico, o sinal é transportado por neurotransmissores de um neurónio para o outro. Um impulso no neurónio pré-sináptico faz com que as vesículas que contêm os neurotransmissores se fundam com a membrana do axónio. As vesículas sinápticas libertam, assim, os neurotransmissores para a fenda sináptica por exocitose. Esses neurotransmissores ligam-se a proteínas recetoras específicas da célula pós-sináptica, havendo passagem da informação por indução de uma despolarização da célula pós-sináptica.²⁷

Os neurotransmissores podem ser categorizados, essencialmente, em três grupos, dependendo da sua natureza química: aminas biogénicas, aminoácidos e péptidos. Estes funcionam como mensageiros químicos possibilitando a comunicação entre neurónios, bem como com as restantes células-alvo. Alterações nos níveis de determinados neurotransmissores poderá por em causa a comunicação interneuronal, alterando, assim, circuitos neurais podendo levar a implicações como mecanismos apoptóticos e processos neurodegenerativos.²⁷

Um dos fenómenos que ocorre nas doenças neurodegenerativas responsável pela morte neuronal é a excitotoxicidade, sendo que esta pode ser causada por um excesso de glutamato no espaço extracelular. O **glutamato** é um aminoácido que é produzido no organismo e é um importante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso. Em situações patológicas cerebrais, os transportadores podem funcionar de forma reversa e causar a acumulação excessiva de glutamato no espaço extracelular. Esta inversão provoca a entrada de grandes quantidades de iões cálcio (Ca^{2+}) nas células, através de recetores NDMA (*N*-metil-D-Aspartato), levando a danos neuronais como a perda gradual da memória e eventualmente morte cerebral.

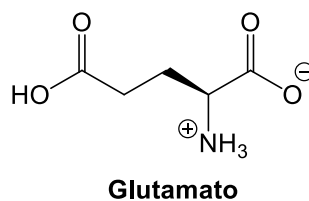


Figura 8 - Estrutura química do **glutamato**

Consequentemente existe várias síndromes neurodegenerativas devido a alterações dos níveis de alguns neurotransmissores. Mais especificadamente, no caso

da Síndrome de Alzheimer (SA) há uma diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh) ²⁸, na Síndrome de Parkinson são os níveis de dopamina (DA) que se encontram diminuídos²⁹ mas no que se refere à Esclerose Amiotrófica Lateral esta está relacionada com o aumento dos níveis de glutamato (Glu) ³⁰.

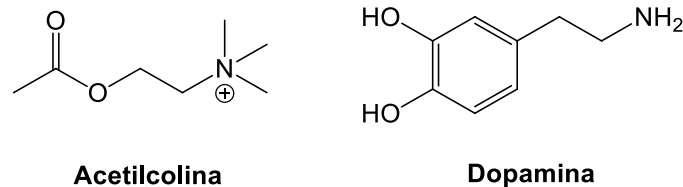


Figura 9 - Estrutura química dos neurotransmissores **acetilcolina** e **dopamina**

1.3.1 Síndrome de Parkinson

A Síndrome de Parkinson é a segunda perturbação neurodegenerativa mais comum, afetando, aproximadamente, 1% dos adultos com mais de 60 anos de idade. A sua incidência aumenta de 3% a 5% para pessoas com idade superior a 85 anos. A prevalência da doença de Parkinson em países industrializados estima-se que afeta até 3% da população geral.³¹

Os primeiros sintomas são o tremor, rigidez e perda de reflexos posturais. A perda dos reflexos posturais desenvolve-se na maioria dos pacientes ao longo do progresso da doença, provocando perdas de equilíbrio e dificuldade nos movimentos.

Esta síndrome está relacionada com a diminuição dos neurotransmissores de dopamina e com a presença de corpos de Lewy. Um dos principais constituintes dos corpos de Lewy é a proteína α -sinucleína mutada. A parkina é um dos membros da família da ligase ubiquitina, responsável pela ubiquitinação, um processo de marcação de proteínas para a degradação através de proteossoma. Este sistema ubiquitina-proteossoma é importante para a proteólise intracelular e é responsável por diversos processos que mantêm a viabilidade das células. Uma falha neste sistema conduz a uma agregação anormal intracelular de proteínas, incluído a α -sinucleína podendo levar a formação de corpos de Lewy. Os corpos de Lewy podem ser importantes na ativação de vias que conduzem à disfunção e morte neuronal.³²

1.3.1.1 Diagnóstico clínico

Os principais sintomas da síndrome de Parkinson são a bradicinesia (dificuldade na iniciação do movimento), rigidez muscular (dificuldade no relaxamento dos músculos), instabilidade postural (dificuldades de manter o equilíbrio) e tremor de

repouso (essencialmente nas mãos e nos pés). Outros sintomas mais subtis como é o caso de modificações na caligrafia ou redução da expressão facial, são geralmente características precoces da manifestação da sintomatologia. À medida que a neurodegeneração progride verifica-se também hipofonia (voz fraca devido à incoordenação dos músculos vocais), redução dos movimentos de deglutição e alterações dos reflexos. Complicações não motoras associadas à SP tornam-se mais graves à medida que a neurodegeneração aumenta, havendo desenvolvimento de quadros depressivos em cerca de 40% dos pacientes. O tremor de cabeça e na voz poderão também estar presentes.³³

1.3.1.2 Tratamento

A principal causa da síndrome de Parkinson é a diminuição de neurotransmissores de dopamina. Para entender a estratégia farmacêutica é importante se conhecer o ciclo metabólico da dopamina no organismo humano. A biossíntese da dopamina ocorre a partir da hidroxilação da L-tirosina através da tirosina hidrosilase formando-se L-DOPA, na presença de tetra-hidrobiopterina (THB). L-DOPA é depois descarboxilada formando dopamina através da L-dopa descarboxilase, como está representado na Figura 10.

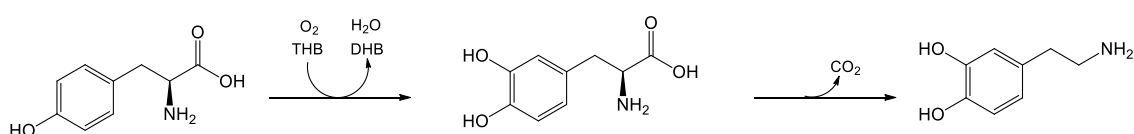


Figura 10 - Representação da biossíntese da dopamina a partir da L-tirosina

No interior das células dopaminérgicas, a dopamina é metabolizada em duas reações sucessivas (Figura 11). Primeiro, a monoamina oxidase B (MAO-B) converte a dopamina em 3,4-dihidroxfenilacetaldeído (DOPAL) e peróxido de hidrogénio. Por sua vez este aldeído serve de substrato à aldeído desidrogenase produzindo-se o ácido 3,4-di-hidroxfenilacetico (DOPAC). Em seguida, o DOPAC difunde-se para o meio extracelular e pode ser conjugado com glucorónidos ou convertido a ácido homovanílico (HVA) pelo catecol-O-metiltransferase (COMT). Uma fração de dopamina que é libertada pode ser O-metilada pelo COMT a 3-metoxitiramina (3-MT) e depois oxidada pelo MAO-B para formar HVA por células gliais.³⁴

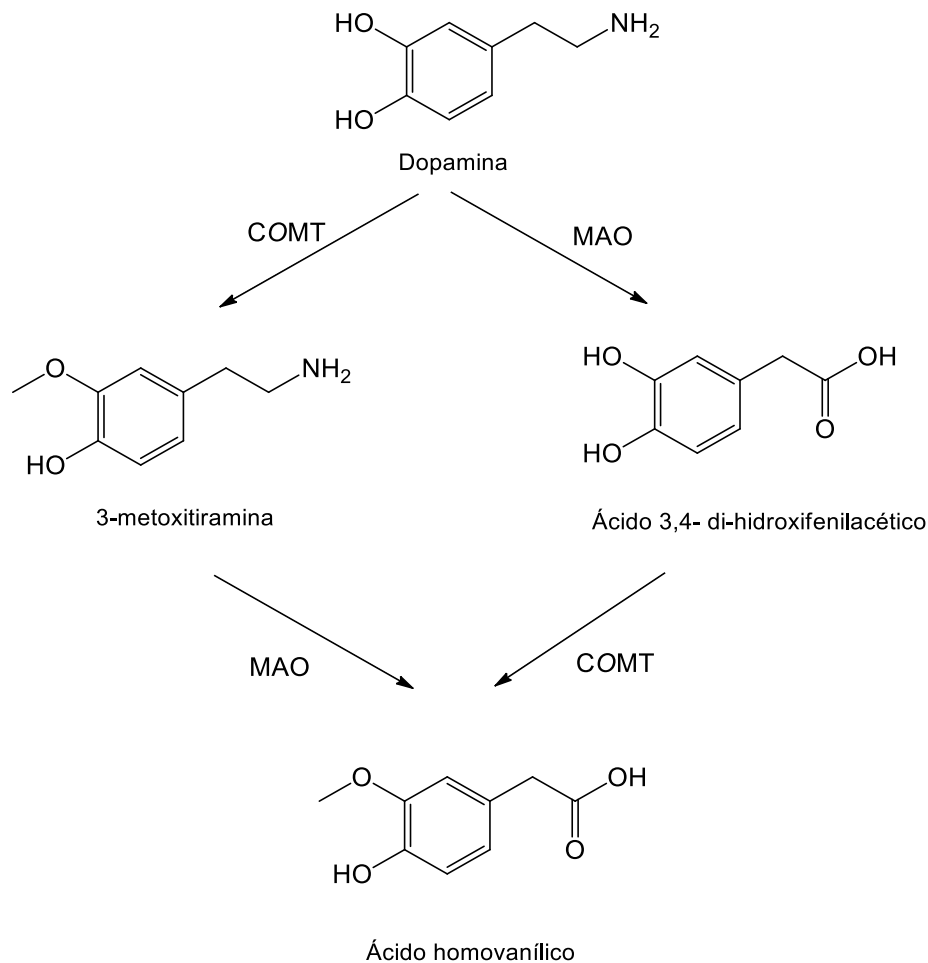


Figura 11 - Representação do metabolismo da dopamina

O tratamento para esta patologia neurodegenerativa visa atenuar os seus sintomas através da reposição do equilíbrio entre a dopamina e o ácido homovanílico, Para tal, podem ser empregues diferentes estratégias que visam o aumento da atividade dopaminérgica, utilizando fármacos que estimulem a produção e libertação de dopamina; indiretamente através, do uso de fármacos inibidores do metabolismo da dopamina ou a combinação de ambas as estratégias num esforço sinérgico.

1.3.1.2.1 Levodopa

A levodopa é considerada como o fármaco mais eficaz para o tratamento da Síndrome de Parkinson desde que foi descoberta na década de 70. Esta é normalmente combinada com um inibidor da descarboxilase periférica.

Como já foi referido o tratamento desta doença requer um aumento de dopamina no paciente, uma das opções podia ser a administração deste neurotransmissor. Mas tendo em conta o seu metabolismo e as suas características

bioquímicas e fisiológicas não seria uma boa opção de tratamento uma vez que se trata de uma molécula muito polar e não iria conseguir atravessar a barreira hematoencefálica (estrutura de permeabilidade altamente seletiva que protege o SNC) e ainda devido aos seus efeitos periféricos. Portanto, a solução seria a administração do seu precursor periférico, o aminoácido DOPA já que este consegue atravessar a barreira hematoencefálica devido à existência de um sistema de transporte ativo específico para aminoácidos aromáticos. Quando a levodopa se encontra no SNC sofre descarboxilação enzimática, como já foi referido anteriormente, convertendo-se em dopamina, conseguindo assim, regular a presença deste neurotransmissor.

Contudo, a levodopa não pode ser administrada sem a co-administração de inibidores reversíveis da levodopa descarboxilase (DDC) como a **carbidopa** ou a **benserazida**. Estes inibidores da DDC impedem que a L-dopa seja periféricamente degradada, aumentando a sua concentração no SNC em 70% quando administrados com a levodopa.³³

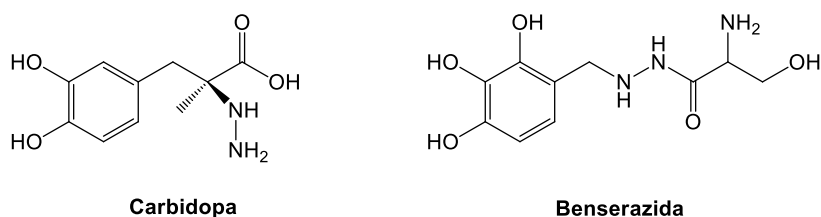


Figura 12 - Estrutura química dos inibidores reversíveis da DDC **carbidopa** e **benserazida**

No entanto, á terapia com levodopa está associado o desenvolvimento de complicações motoras, particularmente em doses mais elevadas de L-DOPA. A prática atual é a utilização de doses mais baixas de L-DOPA para reduzir complicações motoras, embora à custa de um controlo de sintomas menos eficaz. As estratégias alternativas são utilizar monoterapia com um agonista da dopamina, utilizar um inibidor da MAO-B ou inibidor do COMT.

1.3.1.2.2 *Agonistas Dopaminérgicos*

Existem seis agonistas dopaminérgicos disponíveis que podem ser administrados por via oral sendo eles **bromocriptina**, **pergolida**, **cabergolina**, **lisurida**, **ropinirol** e **pramipexol** (Figura 13). Todos estes fármacos funcionam por estimulação dos recetores de dopamina.

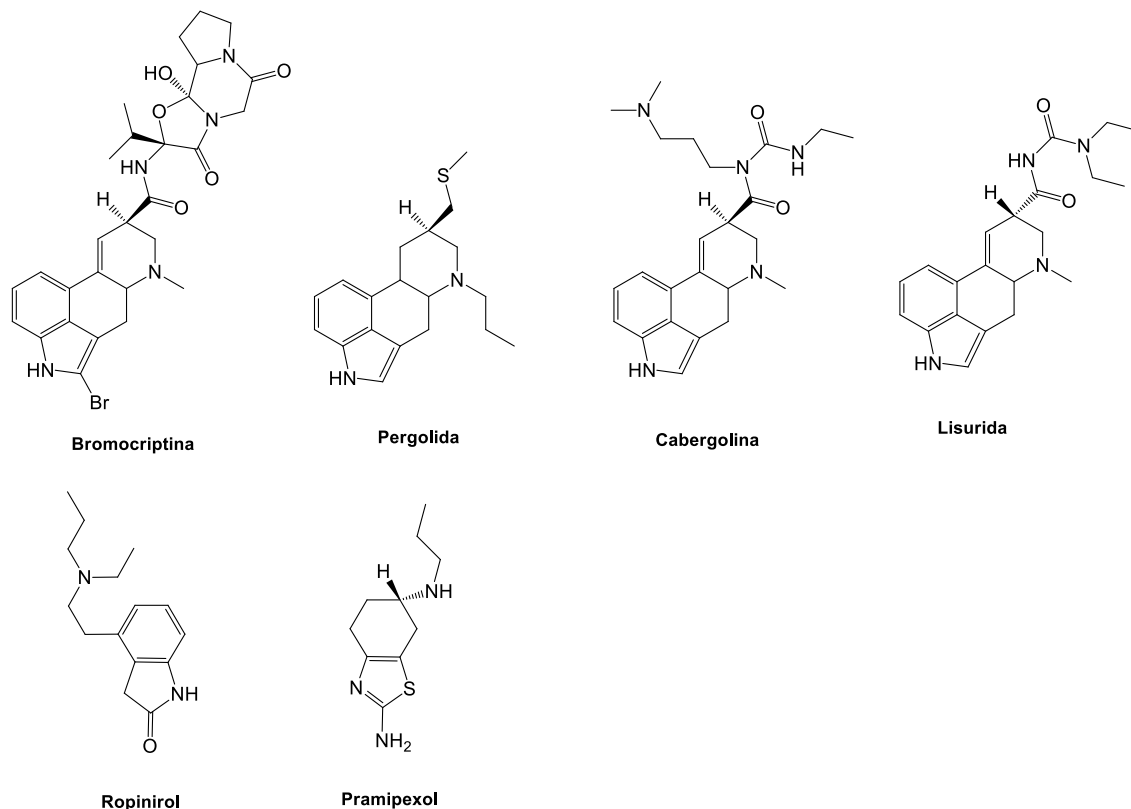


Figura 14 - Estrutura química dos agonistas dopaminérgicos **bromocriptina**, **pergolida**, **carbergolina**, **lisurida**, **ropinirol** e **pramipexol**

Figura 15 - Estrutura química dos agonistas dopaminérgicos **bromocriptina**, **pergolida**, **carbergolina**, **lisurida**, **ropinirol** e **pramipexol**

Inicialmente, a introdução deste tipo de fármacos era para serem administrados juntamente com a levodopa em doentes com Parkinson em estágio avançada. A sua introdução como agentes de primeira linha surgiu recentemente como resultado da sua eficácia na melhoria dos sintomas motores para além da sua capacidade para retardar a introdução de levodopa e o subsequente desenvolvimento de complicações que esta produzia.³³

Ensaio que foram realizados com os agonistas dopaminérgicos mostraram uma redução significativa no desenvolvimento de complicações motoras comparativamente a pacientes que iniciam o tratamento com levodopa.³⁵ No entanto, nos ensaios publicados relativamente ao ropinirol e ao pramipexol, os pacientes tratados com levodopa mostraram uma melhora mais significativa.³⁶ O perfil de efeitos colaterais dos agonistas da dopamina são semelhantes à levodopa, mas há indícios de efeitos secundários como é o caso de alucinações.³³

Existe muita controvérsia relativamente à segurança destes agonistas dopaminérgicos, havendo indícios de que estes efeitos secundários acontecem mais

frequentemente em pacientes de idade mais avançada, não descurando os possíveis efeitos secundários em pacientes mais jovens, alertando que estes devem ser sujeitos a acompanhamento médico aquando da terapêutica com agonistas dopaminérgicos.

1.3.1.2.3 Inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B)

Os inibidores da MAO-B foram utilizados segundo o estudo DATATOP (*Deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism*) pela sua eficácia comprovada na melhora dos sintomas e pelo efeito neuroprotetor que demonstraram.³⁷

No entanto, um estudo posterior com mais de 700 pacientes com um leve início da doença mostrou um aumento significativo da mortalidade em doentes tratados com **selegilina** (Figura 14) e levodopa em comparação com a utilização isolada de levodopa ou bromocriptina. No entanto, estudos posteriores não confirmaram estes mesmos resultados, tendo mesmo resultados que apontavam para o oposto, ou seja, uma possível redução na mortalidade. Um estudo mais recente em que envolveu 3525 pacientes revela que os inibidores do MAO-B reduzem a necessidade de levodopa e a incidência de flutuações motoras, sem efeitos secundários substanciais ou riscos de mortalidade acrescidos.³⁸

Estudos utilizando **rasagilina**, representada na Figura 14, têm demonstrado eficácia no início da doença e durante o avanço da mesma.³⁹

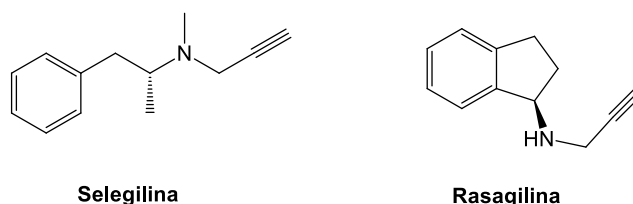


Figura 16 - Estrutura química dos inibidores da MAO-B **selegilina** e **rasagilina**

1.3.1.2.4 Inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT)

A COMT é uma enzima envolvido no metabolismo periférico da L-DOPA. Neste grupo de fármacos destacam-se o **entacapona**, que complementa a ação dos inibidores do descarboxilase de aminoácidos. Partindo do princípio que o volume de distribuição permanece inalterado, a adição de entacapona aumenta a semi-vida plasmática de levodopa em 45% depois de cada dose. Da mesma forma, o **tolcapona** produz um aumento da semi-vida da levodopa, mesmo que este seja dado de forma independente do regime de dose de levodopa. Tanto a estrutura química do entacapona como do tolcapona estão representadas na Figura 15.

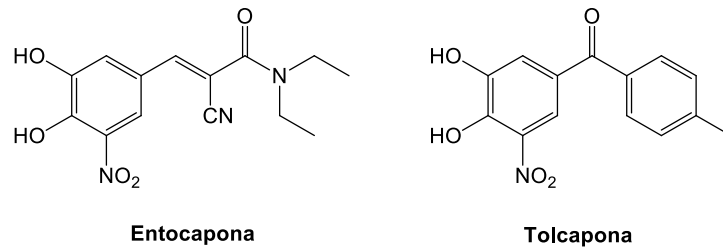


Figura 18 - Estrutura química dos inibidores de COMT de **entacapona** e **tolcapona**

Quando entacapona ou tolcapona são adicionados à terapia com levodopa, estes inibem a COMT, uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo da dopamina, resultando num aumento dos níveis de dopamina no sistema nervoso central comparativamente à terapia com levodopa isolada, produzindo, assim, uma ação prolongada e melhorias posteriores na função motora.

1.3.2 Alzheimer

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência, um termo geral para a perda de memória e outras capacidades intelectuais graves o suficiente para interferir com a vida diária do ser humano. A doença de Alzheimer é responsável por 60 a 80 por cento dos casos de demência. A doença de Alzheimer não é uma parte normal do envelhecimento, embora o maior fator de risco conhecido é o aumento da idade, sendo que a maioria das pessoas com esta doença apresentam mais de 64 anos. Mas a doença de Alzheimer não é exclusiva da terceira idade, uma vez que 5 por cento das pessoas com a doença têm início precoce.

A doença de Alzheimer é uma doença progressiva, em que os sintomas da demência pioram gradualmente ao longo de vários anos. No seu estágio inicial, a perda de memória é leve, mas com fase final da doença de Alzheimer, os indivíduos perdem a capacidade de manter uma conversa e responder ao seu ambiente.

Esta doença caracteriza-se pela perda progressiva de neurónios que é traduzida, posteriormente, pela diminuição gradual da memória e de outras funções cognitivas, o que leva a demência. Geralmente, o sintoma inicial é a incapacidade de memorizar acontecimentos presentes e à medida que a doença evolui outros sintomas vão aparecendo como confusão, irritabilidade mental, alteração de humor, perda de memória de acontecimentos antigos, entre outros. Gradualmente, a doença provoca a perda de funções biológicas e que finalmente pode levar a morte.

1.3.2.1 Diagnóstico clínico

Para a maioria das pessoas com Alzheimer o primeiro sintoma são os lapsos de memória. Em particular, os pacientes têm mais dificuldade em lembrar eventos mais recentes e em reter novas informações. Estes sintomas são causados por danos no hipocampo que, por sua vez, possui o papel principal na memória do dia-a-dia. Esta perda de memória vai acabando por interferir no quotidiano do paciente, principalmente à medida que a doença progride.

Com a evolução da doença vão surgindo novas dificuldades relativamente à forma de pensar, raciocinar ou comunicar. Mais especificamente acabam por ter dificuldades de seguir uma conversa e começam a repetir-se, começam a ter problemas em ver os objetos a três dimensões, dificuldade de tomar decisões, resolver problemas ou seguir uma sequência de tarefas e começam a ficar confusos e a perder a noção do que se passa em seu redor.

Os pacientes no início da doença têm, frequentemente, mudanças de humor, começam a estar mais ansiosos, irritáveis e depressivos.

À medida que a doença progride estes sintomas acabam por ficar mais severos e, nesse estado mais avançado, acabam por não estarem cientes do que se passa à volta deles. Ficam com dificuldade em comer ou a andar e precisam sempre de alguém que os apoie constantemente.

1.3.2.2 Causas e Tratamento

As causas da doença ainda não foram totalmente esclarecidas. Desenvolveram-se três hipóteses sobre as alterações biológicas que se observam nos pacientes que tem Alzheimer, sendo elas o défice de acetilcolina, acumulação das proteínas β amilóide ($A\beta$) e/ou alterações metabólicas.

Não há nenhum medicamento que cure esta doença mas há medicamentos que foram desenvolvidos que conseguem aliviar os sintomas ou diminuir a velocidade de progressão desta doença.

Os principais fármacos para o tratamento do Alzheimer são os inibidores de acetilcolinesterase (AChE) porém têm sido realizados muitos estudos tendo em conta as duas outras hipóteses de causas desta doença neurodegenerativa para conseguir obter fármacos mais eficazes.

1.3.2.2.1 *Diminuição de acetilcolina*

A acetilcolina é um composto químico importante no envio de mensagens entre determinadas células nervosas e a diminuição deste composto pode comprometer as

funções cognitivas dos pacientes. O déficit de acetilcolina foi a primeira causa encontrada para explicar esta doença em 1976. Desde então foram desenvolvidos fármacos anticolinérgicos que são indicados para o tratamento da doença quando esta ainda não está num estágio muito avançado.⁴⁰

É possível observar-se nos pacientes com Alzheimer um déficit na transmissão colinérgica central o que acaba por ser uma característica patológica e neuroquímica muito significativa. O tratamento farmacológico desta patologia visa melhorar a neurotransmissão colinérgica e, para tal, a estratégia é utilizar fármacos que potenciam a síntese deste composto químico, agonistas de recetores muscarínicos ou inibidores da acetilcolinesterase. Estes últimos são os fármacos utilizados como a primeira linha de tratamentos para o Alzheimer.

Os fármacos mais utilizados são **donepezil**,⁴¹ **rivastigmina**⁴² e **galantamina**⁴³ (Figura 16) e a sua função é prevenir que a enzima acetilcolinesterase quebre a acetilcolina no cérebro conseguindo assim o aumento da sua concentração e permanência na sinapse neuronal. Estes fármacos permitem somente um atraso ou alívio dos sintomas clínicos que o Alzheimer provoca.

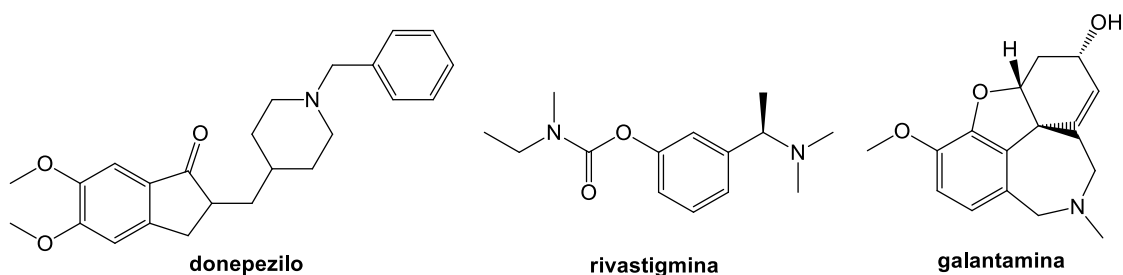


Figura 20 - Estrutura química de **donepezilo**, **rivastigmina** e **galantamina**

1.3.2.2.2 *Acumulação da proteína β amilóide ($A\beta$)*

O metabolismo anormal da proteína β amilóide tem um papel importante no desenvolvimento desta patologia e acumulação desta proteína no cérebro é uma característica que se observa nos portadores desta doença. A proteína $A\beta$ é produto da clivagem da proteína precursora de β -amilóide (PPA) (proteína transmembranar encontrada na maioria das células). No cérebro estes péptidos agregam-se em dímeros e multímeros formando, posteriormente, oligómeros solúveis e, finalmente, placas amiloides que são tóxicas para as células nervosas. Normalmente, a $A\beta$ é removida do cérebro por enzimas que clivam o péptido ou por outras proteínas que ajudam a transportá-la para fora do cérebro para evitar a sua acumulação. No entanto, a via amiloidogénica pode ser promovida pelas condições ambientais, estilo de vida, condições hormonais ou genéticas que acaba por resultar em níveis elevados do péptido e estar origem desta doença neurodegenerativa.⁴⁴

As terapias baseadas nesta possível causa para o desenvolvimento do Alzheimer encontram-se numa fase avançada de desenvolvimento e os modelos sugerem que terapias anti-A β podem ser eficazes para retardar o avanço da doença. Porém os resultados obtidos em pacientes portadores da doença demonstraram que são menos eficientes do que se estava a pensar. Um exemplo é o anticorpo Bapineuzumab que é específico para a proteína A β ligando-se de uma forma dependente da conformação, reconhece extremos *N*-terminal de cinco resíduos da proteína em forma de hélice.⁴⁵ É o único anticorpo clinicamente relatado capaz de reduzir a carga amiloide cerebral. No entanto, o ensaio em fase III foi interrompida prematuramente quando se verificou que doses elevadas originavam edema vasogénico e outras anomalias.

1.3.2.2.3 *Alterações metabólicas*

A diminuição do metabolismo da glucose precede ao aparecimento da patologia cerebral e à deterioração cognitiva, mas a sua causa inicial ainda não é conhecida. Estudos recentes têm demonstrado que a insulina não só regula o metabolismo da glucose e dos lípidos no cérebro como também regula a atividade neuronal, desempenhando um papel relevante nos processos de memória e de aprendizagem.⁴⁶ Estes estudos propuseram, portanto, que a sinalização deficiente de insulina no cérebro pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de transtornos neurodegenerativos. Esta teoria foi apoiada por estudos recentes que demonstraram uma melhoria nos processos cognitivos e na memória dos pacientes com Alzheimer tratados com insulina. No entanto, tratamentos durante largos períodos não é conveniente pois pode agravar a dessensibilização dos recetores de insulina.⁴⁷

1.4 GPE como agente neuroprotetor

O fator de crescimento insulínico tipo I (IGF-1) é um péptido de ocorrência natural e que apresenta uma forte atividade neurotrófica no sistema nervoso central.⁴⁸ Um dos efeitos neuroprotetores é a prevenção *in vivo* da apoptose neuronal e, ainda, a redução da perda neuronal em determinadas regiões após lesão.⁴⁹ Estas funções biológicas realizam-se por interação dos seus recetores distribuídos pelo sistema nervoso central.

Por outro lado, existe evidências que este péptido exerce os seus efeitos através de outros mecanismos e estes são consequência da sua rutura enzimática que

dá lugar aos seus fragmentos. Dentro desses fragmentos os mais importantes são des-(1-3)-IGF-1 e o tripéptido *N*-terminal GPE, pois ambos apresentam propriedades neuroprotetoras. Estes péptidos têm interesse clínico principalmente pela sua estabilidade e pelo seu tamanho reduzido.^{50,51}

1.4.1 Atividade neuroprotetora do GPE

Vários estudos mostram que GPE não só atua como agente neuromodulador *in vitro* como também possui atividade neuroprotetora.⁵² Este tripéptido apresenta diversas ações reguladoras no cérebro, sendo capaz de modular a liberação de certos neurotransmissores como é o caso de acetilcolina e de dopamina. Outros estudos mostram que a administração de GPE exerce efeitos neuroprotetores após processos isquêmicos reduzindo a apoptose e ainda é capaz de prevenir a perda neuronal depois de um processo de isquemia-hipóxica.

Até ao momento, não é conhecido a presença de um sistema enzimático específico para a degradação deste tripéptido mas sabe-se que este tem um tempo de semivida curto e a sua degradação *in vivo* é rápida por ação de peptidases e por estas razões a administração intravenosa é a mais adequada.

Relativamente ao seu mecanismo de ação para produzir os seus efeitos biológicos sugere-se que este tripéptido se fixa nas células gliais conduzindo a liberação de agentes neuroprotetores. Por outro lado, sabe-se que a bioatividade deste tripéptido não é mediada pelos recetores de IGF-1 mas sim pelos recetores do ácido *N*-metil-D-aspartato (NMDA), um recetor ionotrópico (canal para iões ativado por ligantes) do ácido glutâmico.⁵⁰

Têm sido realizados estudos com o objetivo de explorar a ação do GPE em doenças neurodegenerativas. Nesses estudos, o GPE demonstrou ser capaz de atuar como agente de resgate neuronal em modelos de animais com Parkinson após a administração de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), um composto orgânico sintético neurotóxico utilizado para induzir a doença nos ratinhos, induzindo a degeneração de neurónios da substância negra. Apesar do mecanismo de ação não ser conhecido, este tripéptido pode ser um bom candidato para o tratamento da Síndrome de Parkinson.⁵³

Também foram realizados estudos para verificar a sua ação na doença neurodegenerativa Alzheimer. Sabe-se que a concentração de somatostatina, um importante neurotransmissor envolvido na aprendizagem e na memória, diminui no lobo temporal nos pacientes com esta patologia. Após a administração de A β em ratinhos verificou-se a diminuição desse mesmo neurotransmissor. Num estudo *in vivo* constatou-se que com a administração de GPE resultou numa recuperação dos efeitos produzidos pela proteína A β . O aumento de somatostatina por administração de GPE

pode ser explicada pela capacidade deste tripéptido para estimular a neurotransmissão dopaminérgica uma vez que a estimulação de dopamina conduz a um aumento do número de recetores de somatostatina. Este estudo mostra que o GPE pode afigurar-se como uma nova abordagem para o tratamento de alguns sintomas causados pelo Alzheimer.⁵⁴

Devido a estes processos, o GPE tem sido desenvolvido pelo nome **glipromato** pela Neuren Pharmaceuticals, uma empresa farmacêutica que em 2008 finalizou o seu ensaio clínico da fase III deste tripéptido como neuroprotetor em pacientes que apresentavam problemas cognitivos derivados da cirurgia cardíaca em que havia reconstituição da artéria coronária. Neste ensaio verificou-se a eficácia do glipromato na redução do avanço dos problemas cognitivos dos pacientes e, ainda, uma melhora mais rápida e eficaz após a intervenção cirúrgica.⁵⁵

1.4.2 Análogos do GPE

Ao longo do tempo tem sido desenvolvido vários análogos do GPE de forma a melhorar a sua estabilidade e a sua atividade. O tripéptido GPE é uma molécula promissora como uma ferramenta farmacológica mas devido á sua baixa estabilidade e baixa biodisponibilidade a sua distribuição no sistema nervoso central é baixo.⁵⁶ Como este tem uma hidrólise enzimática rápida e ainda apresenta dificuldades em atravessar as membranas celulares o seu potencial terapêutico acaba por ser limitado daí serem desenvolvidos análogos deste tripéptido.⁵⁷ A simplicidade estrutural do GPE permite a diversas modificações químicas assim como modificações estruturais.

Uma das modificações que se podem fazer é a modificação no aminoácido prolina. Sendo o único aminoácido cíclico, a prolina desempenha um papel importante nas propriedades estruturais e conformacionais dos péptidos e proteínas.⁵⁸ Uma característica deste aminoácido é a capacidade de formar ligações *cis* e a possibilidade de isomerização *cis-trans*. Esta capacidade de isomerização é essencial para regular muitos processos biológicos importantes. Tendo isto em consideração diversos prolinomiméticos foram inseridos no GPE. Dentro de todas as modificações até agora realizadas, a substituição da prolina por α -metil prolina (**NNZ-2566**) foi o análogo com melhores resultados pois permitiu um aumento do tempo de semivida no sangue e no cérebro enquanto mantinha a eficácia neuroprotetora.⁵⁹ **NNZ-2566** foi renomeado para **Trofinetide** em Janeiro de 2015 e encontra-se na fase II dos testes clínicos e a farmacêutica Neuren Pharmaceuticals está em fase de desenvolvimento desde Abril de 2013 da sua forma oral para o tratamento de défices cognitivos após traumatismo cranioencefálico.

Outra modificação estrutural na prolina foi a sua substituição por um anel de tiazolidina (**a**) mas os resultados obtidos não foram tão positivos.⁶⁰ Foi estudada ainda a adição de dois grupos metilo ao anel prolina (**b**) e neste caso verificou-se uma grande afinidade por recetores de glutamato em cérebro de ratos.⁶¹

Os análogos onde se substitui a prolina por *cis*-aminoprolina (**c**) e *trans*-hidroxiprolina (**d**) revelaram uma fraca influência aos recetores de glutamato.⁶² Enquanto a inserção do octahidro indol-2-carboxílico (**e**) não mostrou qualquer alteração significativa comparativamente com o GPE.⁶²

Ainda relativamente á influência aos recetores de glutamato os análogos obtidos pela substituição da prolina por um sistema bicíclico (**f**) e pelo ácido piperídico (**g**) foram os que mostraram maior afinidade.⁶² Apesar de possuírem maior afinidade, estudos demonstraram que estes compostos não eram os mais ativos, sendo que os análogos onde se substituiu a prolina por ácido azetidin-2-carboxílico (**h**), por ácido 1-amino-1-ciclopropano (**i**) e por ácido 1-amino-1-ciclo-hexano (**j**) foram os que obtiveram resultados mais positivos em relação á atividade neuroprotetora.⁶²

Uma outra series de análogos sintetizados foi obtida através da introdução de um sistema espirolactama (**k**). Estes análogos são conformacionalmente restringidos através de uma ponte entre o α -carbono do anel da prolina e o azoto do glutamato, adotando uma conformação *trans*. Os estudos neuroprotetores realizados a estes compostos demonstraram que a restrição conformacional é negativa para a bioatividade.⁶²

Ainda se realizaram análogos em que consistia na alteração da configuração da prolina e do glutamato (**l**) e estes mostraram uma grande eficácia como neuroprotetores.⁶³

Também se desenvolveram outros análogos de GPE onde as modificações se realizaram nos outros aminoácidos. Pode-se destacar os análogos onde a modificação na glicina foi a adição de um metil (**m**) com o objetivo de aumentar a lipofilicidade e quando sofria alquilação no grupo amino terminal com o grupo metil aumentar a permeabilidade transmembranar.⁶⁴ No caso das modificações no ácido glutâmico pode-se destacar os análogos onde havia substituição no grupo carboxílico por dois grupo metil (**n**) e estes demonstraram um aumento da resistência proteólítica e de lipofilicidade que acaba por facilitar o transporte através das membranas.⁶⁰

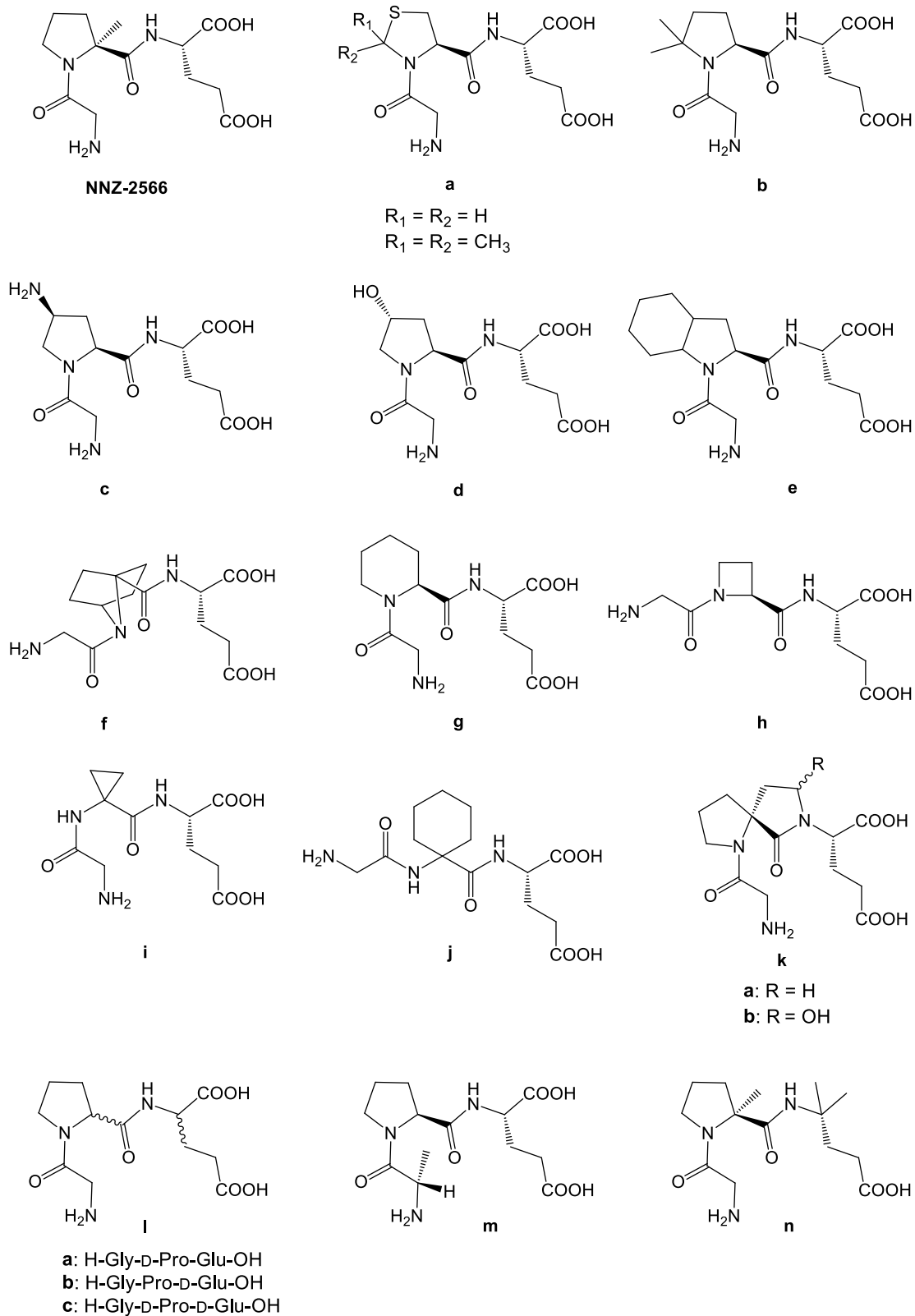


Figura 23 - Estruturas químicas dos análogos de GPE desenvolvidos até ao momento

1.5 PLG como agente neuroprotetor

O tripéptido L-prolil-L-leucilglicinamida (PLG), também conhecido como fator de inibição da libertação da hormona estimuladora de melanócitos (MIF-1), é um tripéptido hipotalâmico endógeno derivado da clivagem da hormona oxitocina.⁶⁵ O PLG possui atividade neurofarmacológica significativa no sistema nervoso central pela sua habilidade de potenciar os efeitos comportamentais da levodopa⁶⁶ e, ainda, por aumentar a afinidade dos agonistas dopaminérgicos nos recetores D₂ tais como *N*-propilnorapomorfinina (NPA), apomorfinina e 2-amino-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno (ADTN)⁶⁵. O tripéptido PLG atua como modulador positivo dos recetores dopaminérgicos D₂.

1.5.1 PLG como modulador alostérico

Os moduladores alostéricos ligam-se num local distinto do local ativo do recetor alvo. Estes moduladores são capazes de induzir mudanças conformacionais acabando por alterar a forma como o seu recetor alvo irá responder ao ligando endógeno. Podendo ter um efeito positivo, aumentando o seu efeito, ou um efeito negativo, em que diminui o seu efeito. Os moduladores alostéricos surgiram recentemente como candidatos promissores para o tratamento estágios mais avançados da doença. Ao contrário dos ligandos ortostéricos, os ligandos alostéricos não competem com ligando endógeno e a sua atividade é totalmente dependente da sinalização fisiológica.

Os recetores de dopamina podem ser divididos em dois grupos: os recetores D₁ e D₂. Esta classificação é feita tendo por base as observações bioquímicas que revelam o efeito modulatório da atividade do adenilato ciclase (AC) por parte da dopamina e ainda pelas diferenças das suas propriedades farmacológicas. Cada grupo esta subdividido em outros grupos devido á heterogeneidade em termos bioquímicos, farmacológicos e fisiológicos que se observa. A classe D₁ inclui os subtipos D₁ e D₅ e a classe D₂ inclui os subtipos D_{2L}, D_{2S}, D₃ e D₄. Os recetores D₁ são os mais abundantes no SNC, localizando-se em todas as áreas do cérebro que recebem inervação dopaminérgica, já os recetores D₂ localizam-se nos neurónios que sintetizam dopamina.

O PLG é capaz de atuar como um modulador positivo dos recetores de D₂ de dopamina, ou seja, permitindo assim um aumento dos efeitos de resposta destes recetores o que pode ser uma mais-valia para o desenvolvimento de fármacos para patologias neurodegenerativas como é o caso do Parkinson.

O mecanismo modulador despoletado pelo PLG ainda não está definido até ao momento. Porém, são propostas duas possíveis *vias* que tentam dar resposta a esta questão: especula-se que o PLG possua interação direta com um domínio do recetor

diferente do seu local ortostérico, ou até mesmo através de um mecanismo indireto associado ao aumento da taxa de hidrólise de GTP por parte da proteína G (proteínas envolvidas na ativação de sinalização intracelular por interação com GTP),⁶⁷ contudo esta última hipótese parece menos provável, na medida que, o efeito modulador não se observa noutros recetores acoplados a proteínas G, como é o caso dos recetores dopaminérgicos da família D₁.

Por Estudos de espectroscopia de RMN e computacionais indicam que o PLG, embora seja uma molécula flexível, pode mudar de conformação. A estrutura cristalina analisada por raio-X mostra que o PLG assume uma estrutura secundária folha- β do tipo II.⁶⁸

1.5.2 Análogos de PLG

Apesar do perfil farmacológico do PLG sugerir que esta molécula tem potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como é o caso do Parkinson, a natureza deste tripéptido limita o seu potencial como fármaco.⁶⁹

Uma abordagem para a síntese de análogos do PLG conformacionalmente restringidos foi a introdução de um anel lactâmico.⁶⁸ Dentro desse grupo de análogos o pirrolidinilcarbonilamino-2-oxopirrolidinacetamida, **PAOPA**, é o que demonstra ser o mais eficaz. O PAOPA mostrou ser capaz de aumentar alostericamente a ligação a recetores D₂ de dopamina em testes *in vivo*, conseguindo que os recetores de dopamina passem de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade. Também se mostrou eficaz após a administração de 6-OHDA em modelos com ratos, sendo uma mais-valia para a doença de Parkinson.⁶⁸

Após estes resultados, os mesmos autores inseriram outros elementos de restrição parcial na estrutura do PLG alcançando vários análogos, porém nenhum deles revelou uma atividade superior ao análogo PAOPA.

Foram sintetizados análogos onde foram incorporados grupos lipofílicos na estrutura para mimetizar a cadeia lateral isobutilo da leucina (**o**) e estes mostraram um aumento de atividade sugerindo que a cadeia lateral lipofílica reforça a ligação dos compostos ao local de ligação do PLG.⁷⁰

Apesar de inúmeros trabalhos sugerirem que a conformação bioativa do PLG é folha- β do tipo II, foram sintetizados análogos onde usaram derivados piridínicos na síntese de miméticos do PLG (**p**). Análises conformacionais destes miméticos revelaram que estes não adotam a conformação folha- β do tipo II. Contudo ensaios farmacológicos mostraram que estes miméticos são mais eficazes na modulação positiva da NPA nos recetores D₂ humanos do que o próprio PLG.⁶⁸

Um outro tipo de análogos foi a introdução de um sistema bicíclico (**q**) e estes mostraram um aumento significativo da modulação com os recetores de dopamina. Obtiveram peptidomiméticos do PLG ao combinar um composto espiro e um composto bicíclico (**r**). Estas estruturas também atuaram como excelente miméticos de uma estrutura folha- β do tipo II e ainda mostraram uma elevada atividade ao passar os recetores de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade. Também apresentaram uma resposta eficaz aquando da administração de 6-OHDA.

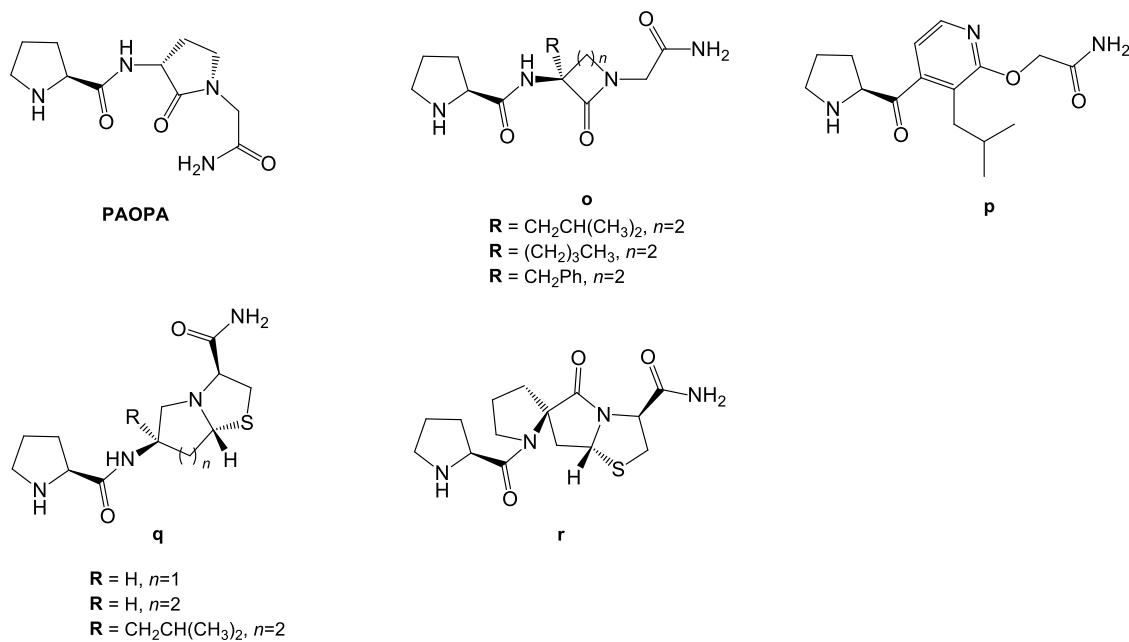


Figura 25 - Estruturas químicas dos análogos de PLG desenvolvidos

1.6 Âmbito da dissertação, objetivo e plano de trabalho

1.6.1 Âmbito da dissertação

O presente trabalho insere-se no âmbito da dissertação do Mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Esta dissertação foi desenvolvida em parceria com a Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP) e a Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela (USC) ao abrigo do programa ERASMUS+ sob orientação do Professor Doutor José Enrique Borges (FCUP), Professor Doutor Xerardo García Mera (USC) e do acompanhamento do doutorando Ivo Emanuel Sampaio Dias (FCUP).

Esta dissertação insere-se num projeto cujo objetivo é a síntese e avaliação biológica de prolinomiméticos com potencial atividade neuroprotetora em doenças neurodegenerativas, desenvolvidas entre as duas faculdades referidas anteriormente.

1.6.2 Objetivo

Este trabalho tem como principal objetivo o contributo para a investigação de análogos dos tripéptido PLG e GPE que decorrem no grupo de investigação. Mais especificamente a síntese de análogos lipofílicos de prolinomiméticos destes mesmos tripéptidos. Para se aumentar a lipofilicidade adicionou-se uma cadeia hidrocarbonada de 12C e de 6C. Uma outra modificação foi a substituição da prolina pelo sistema bicíclico 2-azanorbornano e ainda se alterou os aminoácidos N-terminal e C-terminal de forma a obter uma maior variedade de compostos para, posteriormente, se conseguir realizar uma análise comparativa.

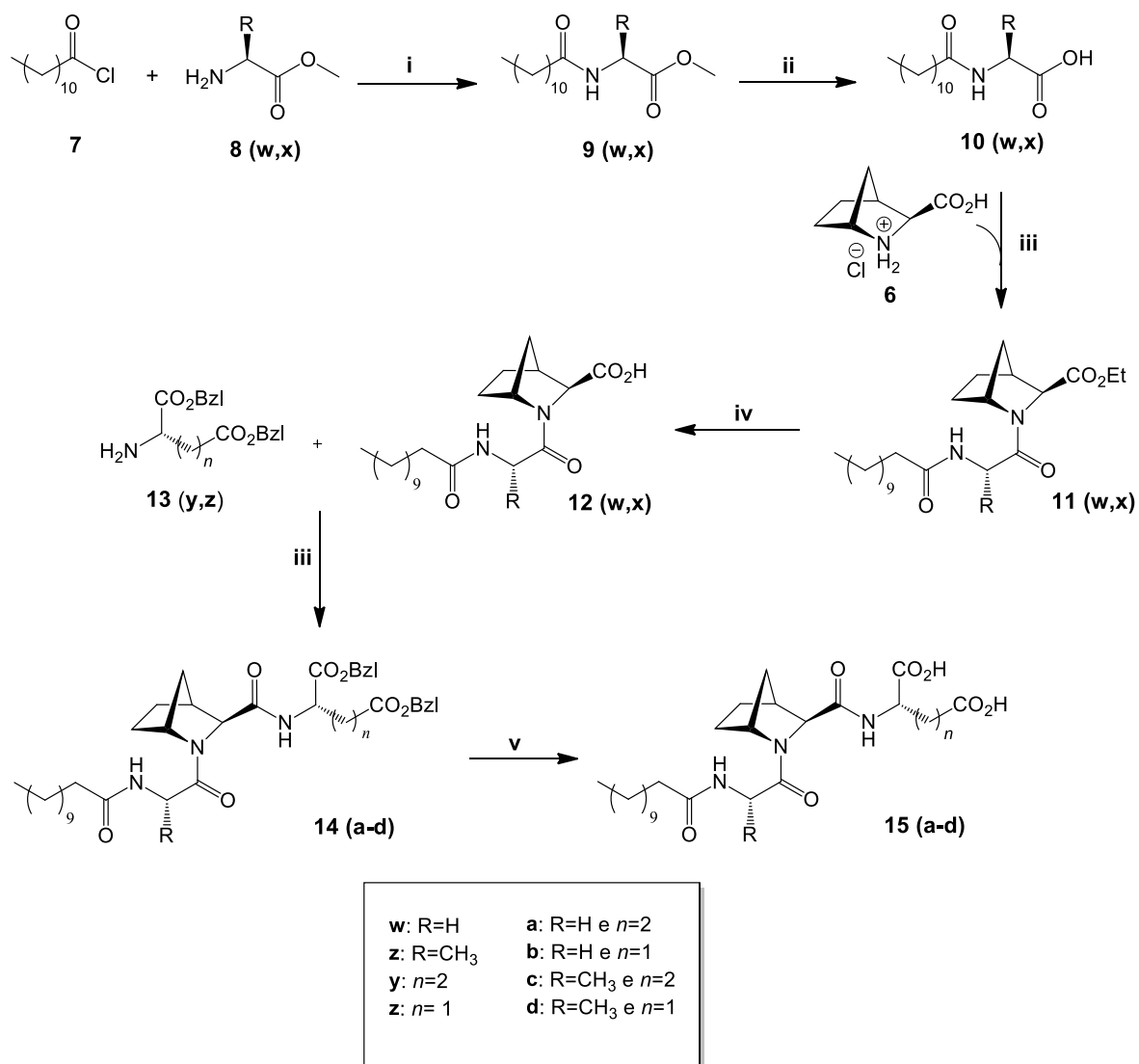
Os análogos prolinomiméticos sintetizados vão ser alvo de avaliações biológicas para verificar a sua atividade neuroprotetora podendo assim desenvolver-se novos fármacos com propriedades farmacológicas melhoradas.

1.6.3 Planos de trabalho

1.6.3.1 Derivados do GPE com 2-azanorbonano

De forma a cumprir os objetivos referidos anteriormente, planeou-se um plano de trabalho para cada análogo que se pretendia sintetizar onde a maioria das reações envolvidas já eram conhecidas. Iniciou-se pela síntese dos análogos de GPE onde o prolinomimético era o sistema 2-azanorbonano. No Esquema 1 está representada a via de síntese utilizada para se obter estes mesmos análogos.

Nesta via sintética, inicialmente adicionou-se uma cadeia lipofílica de 12C aos aminoácidos **8w,x** (alanina ou glicina) através de uma reação de condensação (i) obtendo os aminoácidos gordos **9w,x**. De forma a se remover o grupo éster metílico desses aminoácidos para se obter o respetivo ácido carboxílico **10w,x** recorreu-se a uma hidrólise alcalina (ii). Após esta reação já foi possível realizar-se a primeira reação de acoplamento (iv) para acoplar cada aminoácido **10w,x** com o sistema 2-azanorbornano (**6**), sintetizado previamente através de uma reação de aza-Diels-Alder, obtendo-se os primeiros dipéptidos (**11w,x**). Mais uma vez, o grupo carboxílico estava protegido por um grupo éster (éster etílico) e para o remover foi necessário recorrer-se, novamente, a uma hidrólise alcalina (v) de forma a dar origem ao respetivo ácido carboxílico (**12w,x**). Só após esta reação é que estavam reunidas todas as condições para se realizar a última reação de acoplamento (iv) com os últimos aminoácidos (**13y,z**) (glutamato ou o aspartato) protegidos com o grupo benzoilo (**14a-d**). A última reação para se obter os análogos pretendidos tinha como objetivo a remoção do grupo protetor e para tal recorreu-se a uma hidrogenólise (vi) conseguindo-se, assim, com sucesso obter-se os tripéptidos desejados (**15a-d**).



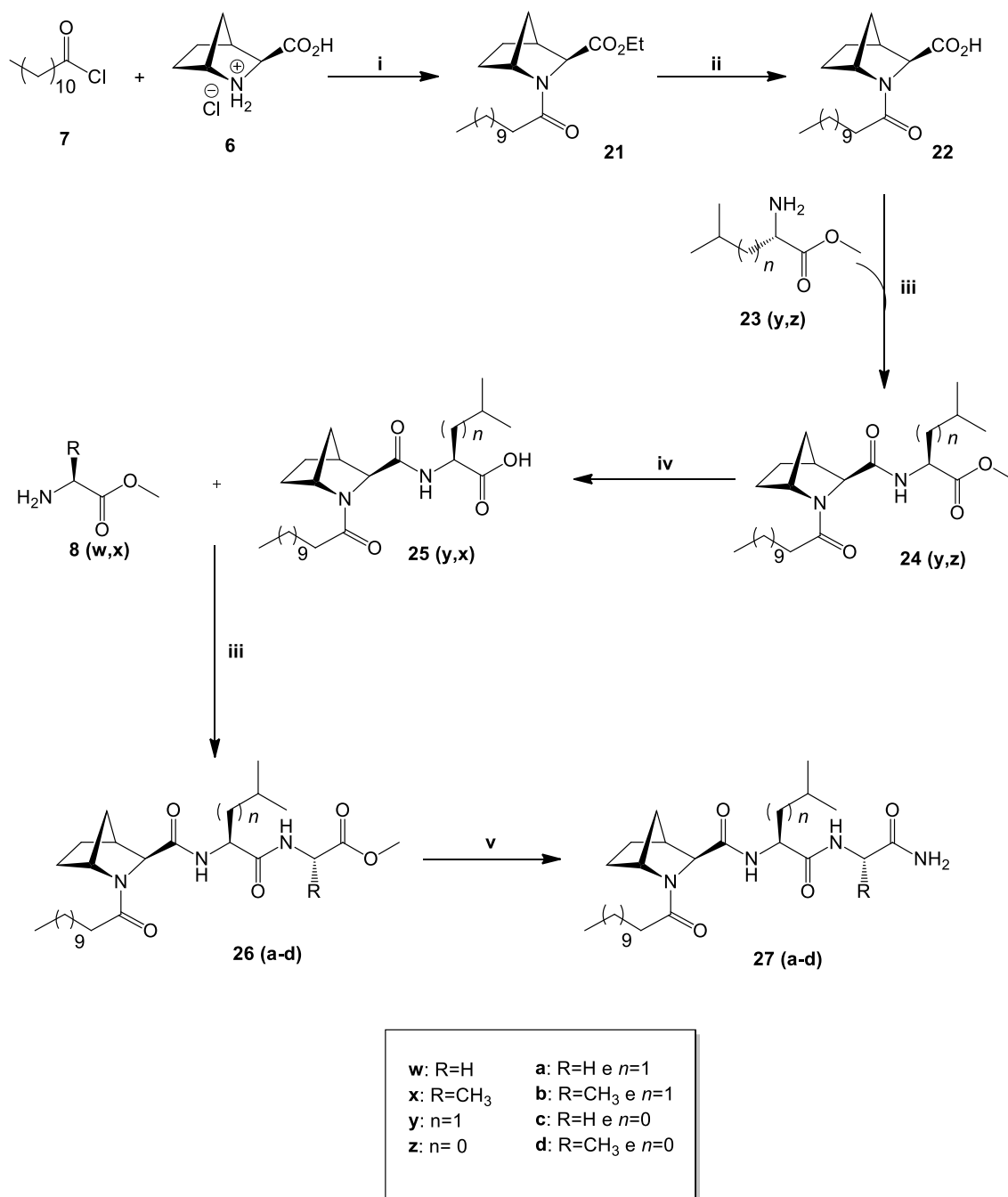
Condições e Reagentes: i) DIEA, DCM, 5h à t_{amb} . ii) LiOH, THF/H₂O, 4h à t_{amb} , H₂SO₄ 1M iii) DIEA, TBTU, DCM, 5h à t_{amb} iv) LiOH, EtOH, 5h à t_{amb} . v) H₂/Pd-C, AcOEt, 5h à t_{amb} .

Esquema 1 - Representação da via de síntese dos derivados de GPE com cadeia de 12C contendo o prolinomimético 2-azanorbornano

1.6.3.2 Derivados de PLG com 2-azanorbonano

O passo seguinte para cumprir os objetivos delineados para este trabalho foi a síntese dos análogos de PLG onde o prolinomimético era o sistema 2-azanorbonano. No Esquema 2 está representada a via de síntese utilizada para se obter estes mesmos análogos.

Esta via sintética é muito semelhante á utilizada para se obter os derivados de GPE onde se usava, também o sistema 2-azanorbonano. Inicialmente adicionou-se uma cadeia lipofílica de 12C ao sistema 2-azanorbonano (**7**) através de uma reação de condensação (**i**) obtendo o aminoácido **21**. De forma a se remover o grupo éster presente neste aminoácido para se obter o respetivo ácido carboxílico **22** recorreu-se a uma hidrólise alcalina (**ii**). Após esta reação já foi possível realizar-se a primeira reação de acoplamento (**iii**) para acoplar este aminoácido lipofílico com outro aminoácido (**23y,x**) (leucina ou valina) obtendo-se assim os primeiros dipéptidos **24y,x**. Mais uma vez o grupo carboxílico estava protegido por um grupo éster metílico e para o remover foi necessário recorrer-se, novamente, a uma hidrólise alcalina (**iv**) de forma a dar origem ao respetivo ácido carboxílico (**25y,x**). Só após esta reação é que estavam reunidas todas as condições para se realizar a última reação de acoplamento (**iv**) com os últimos aminoácidos esterificados (**8w,x**) (glicina ou alanina). No caso dos derivados do PLG o grupo terminal é uma amida e para transformar um grupo éster para um grupo amida recorreu-se a uma reação de aminólise (**v**) conseguindo obter-se com sucesso os tripéptidos desejados (**27a-d**).



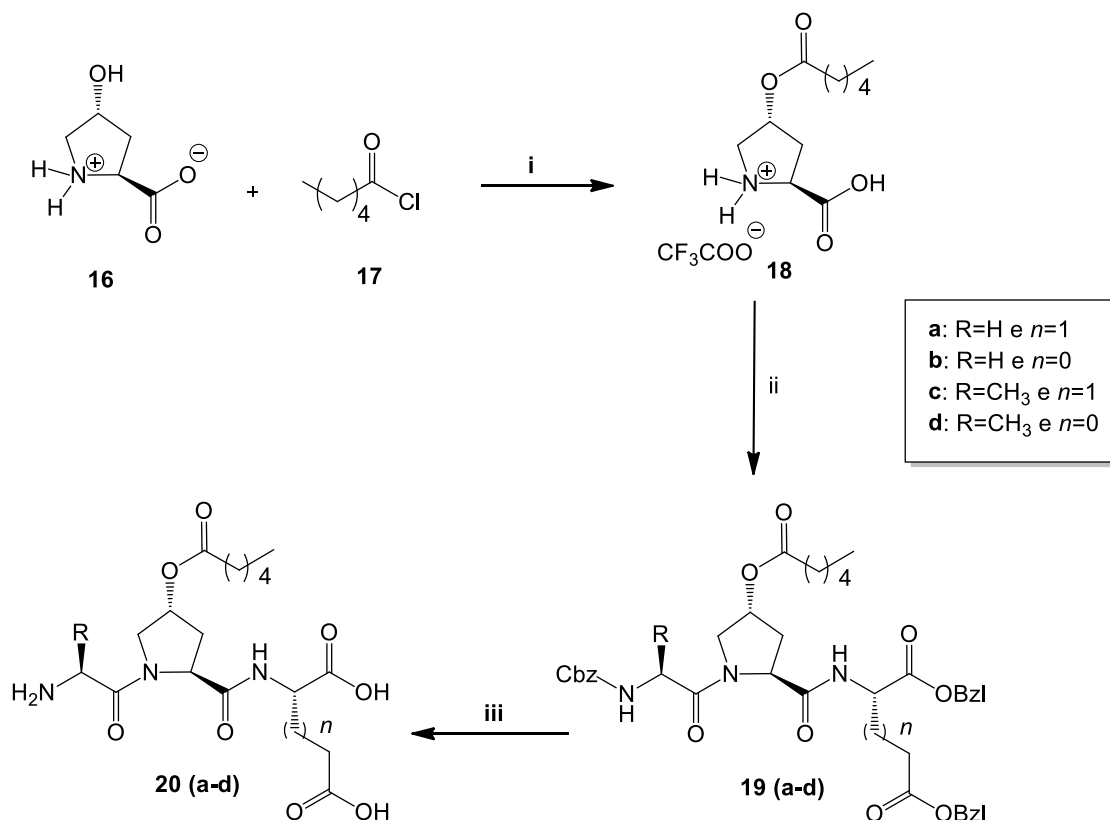
Condições e Reagentes: i) DIEA, DCM, 5h à t_{amb} . ii) LiOH, THF/H₂O, 4h à t_{amb} iii) DIEA, TBTU, DCM, 5h à t_{amb} iv) LIOH, EtOH, 5h à t_{amb} . v) H₂/Pd-C, AcOEt, 5h à t_{amb}

Esquema 2 - Representação da rota de síntese dos derivados de PLG com uma cadeia de 12C contendo o prolinomimético 2-azanorborno

1.6.3.3 Derivados do GPE com 4-hidroxiprolina (Trabalho adicional)

O plano inicial era a síntese tanto de derivados de GPE como de PLG usando o sistema 2-azanorbornano mas após a síntese completa destes conseguiu-se, ainda, desenvolver novos derivados onde se usava a 4-hidroxiprolina através de um novo método de acoplamento *one-pot* desenvolvido pelo grupo de investigação. No Esquema 2 está representada a via de síntese utilizada para se obter estes mesmos análogos.

Para síntese destes derivados só foi necessário recorrer-se a três passos sintéticos, inicialmente recorreu-se a uma reação de *O*-acilação (i) de forma a se adicionar uma cadeia hidrocarbonada de 6C obtendo-se o aminoácido **18**. O passo seguinte foi a reação de acoplamento *one-pot* (ii) desenvolvido pelo grupo de investigação que permitiu obter, através de uma única reação, os tripéptidos **19a-d**. Como os aminoácidos acoplados na reação anterior estavam protegidos, o ultimo passo desta via sintética era a remoção desses mesmos grupos através de uma hidrogenólise (iii) obtendo assim os tripéptidos finais (**20a-d**).



Esquema 4 - Representação da via de síntese dos derivados de GPE com cadeia de 6C usando a 4-hidroxiprolina

Condições e Reagentes: i) TFA, 12h à t_{amb} . ii) DIEA, Z-Gly-OSu ou Z-Ala-OSu, TBTU, H-GluOBzl ou H-AspOBzl, DCM, 5h à t_{amb} iii) H₂/Pd-C, AcOEt, 5h à t_{amb}

2 Apresentação e Discussão de resultados

Parte I: Síntese de 2-azabicyclo[2.2.1]heptano

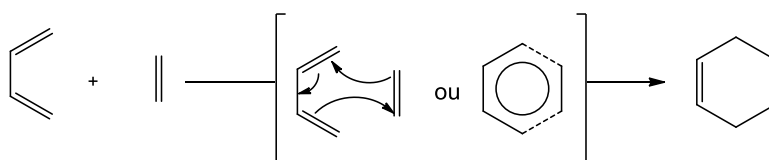
2.1 Síntese do aminoéster 4

Para a obtenção dos análogos de GPE e PLG pretendidos o primeiro passo foi a síntese do prolinomimético **6** (sistema 2-azanorbornano). Para sintetizar este composto recorreu-se a um procedimento descrito por Tararov et al.⁷¹ de forma a obter o sistema bicyclico enantiomericamente puro e com a configuração pretendida através da reação de Diels-Alder.

2.1.1 Reação de Diels-Alder

A reação de Diels-Alder refere-se a uma adição de um dieno conjugado com um alceno dando origem a um ciclo-hexeno substituído. Nesta transformação os átomos das extremidades do dieno adicionam-se á ligação dupla do alceno e fecham o anel. As novas ligações formam-se simultânea e estereoespecificamente.

Esta reação é designada por uma cicloadição [4+2] uma vez que ocorre entre um (hétero)dieno conjugado contendo quatro eletrões π e um alceno substituído, também designado por (hétero)dienófilo, contendo dois eletrões π . O exemplo mais simples deste tipo de reação é o aquecimento da mistura de 1,3-butadieno e eteno, em fase gasosa, para dar origem ao ciclohexeno, como está representado no Esquema 5, com formação de duas novas ligações carbono-carbono.



Esquema 5 - Representação da reação de aquecimento da mistura de 1,3 - butadieno e eteno para se obter o ciclohexeno

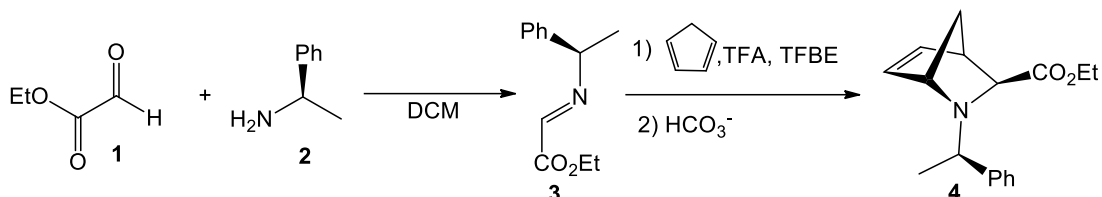
O rendimento desta reação é baixo mas é possível obter rendimentos elevados em reações de Diels-Alder tendo em conta a estrutura eletrónica do dieno e do dienófilo envolvidos na reação. Para tal este tipo de reações é favorecida quando os dienos conjugados são ricos em eletrões, ou seja, quando estes possuem grupos dadores de eletrões. No caso dos dienófilos estes devem ser deficientes em eletrões ou possuírem, pelo menos, um grupo de electronegativo facilitando assim o ataque do dieno.

A reação de Diels-Alder permite a formação de estruturas heterocíclicas caso algum dos carbonos, quer do dieno conjugado quer do dienófilo, possua heteroátomos nas posições das ligações insaturadas. Se o heteroátomo que substitui um desses carbonos for um átomo de azoto a reação passa a designar-se “aza-Diels-

Alder". No caso da síntese do aminoéster **4** esta seguiu uma reação de aza-Diels-Alder heterogênea em que o heteroátomo era um azoto presente no diênofilo (imina **3**).

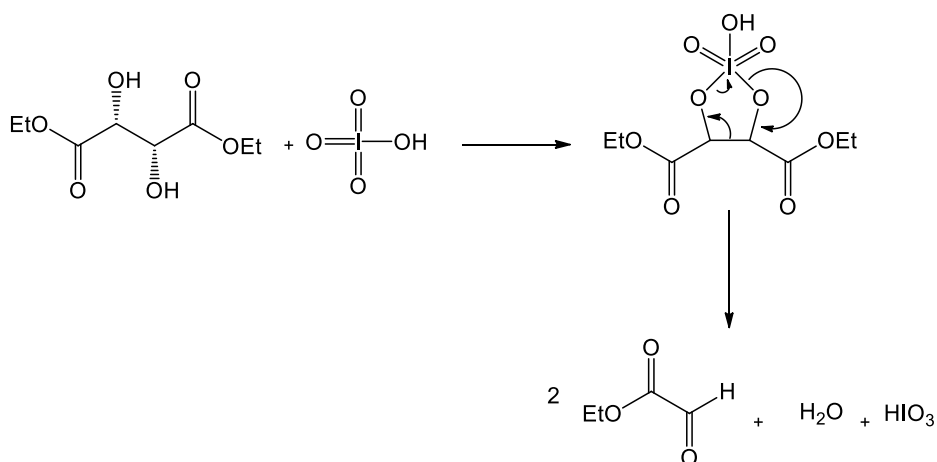
2.1.2 Resultados próprios

Como já foi referido para a síntese do prolinomimético pretendido recorreu-se a um procedimento descrito na bibliografia e o primeiro passo era a obtenção do aminoéster **4** e esta pode ser representada pela reação geral apresentada em baixo (Esquema 6).



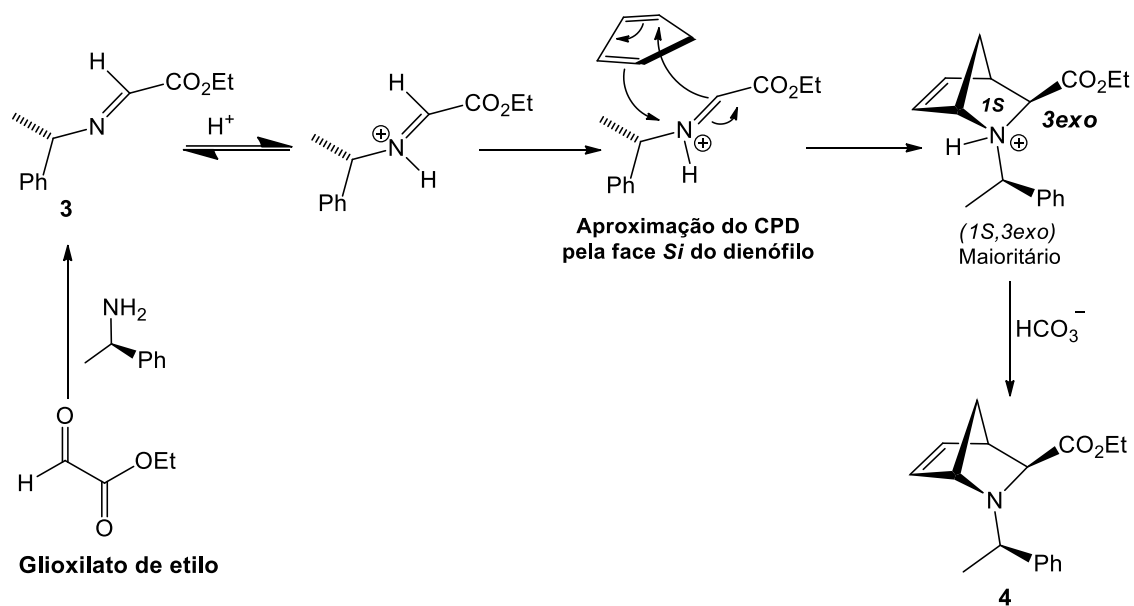
Esquema 6 - Representação da reação de aza-Diels-Alder entre o glioxilato de etilo (**1**) e *R*-feniletilamina (**3**) e ciclopentadieno

Esta reação foi em *one-pot* e inicialmente fez-se reagir o glioxilato de etilo (**1**) com a (*R*)-feniletilamina (**2**) em agitação de forma a se obter a imina **3**. Inicialmente o glioxilato de etilo foi obtido através de cisão oxidativa do L-tartarato de dietilo usando ácido perióico. No Esquema 8 apresenta-se o mecanismo de cisão oxidativa e onde é possível verificar-se que por cada molécula de L-tartarato de dietilo formam-se duas moléculas de glioxilato de etilo (um aldeído), sendo por isso usado 0.5 eq do primeiro composto.



Esquema 8 - Mecanismo de reação da cisão oxidativa para formar o glioxilato de etilo a partir do L-tartarato de dietilo

Posteriormente, após a formação *in situ* da imina **3**, em equilíbrio com a sua forma protonada, adicionou-se o ciclopentadieno (CPD) e é nesta fase que ocorre a reação de aza-Diels-Alder como está representado no Esquema 9. Nesta reação ocorre a formação estereoseletiva do diastereoisómero maioritário *exo* **4** (1*S*,3*exo*). No final da reação realizou-se o tratamento corrente com bicarbonato de sódio para desprotonar a amina terciária e assim obter o crude reacional onde está presente aminoéster **4** numa mistura de diastereoisómeros.



Esquema 9 - Mecanismo da reação heterogênea de Diels-Alder para obter uma mistura de diastereoisómeros onde está presente o aminoéster **4**

2.2 Síntese do aminoéster 5

Após a síntese do aminoéster 4 era necessário a remoção da dupla presente no biciclo e para isso era necessário recorrer-se a uma reação de hidrogenação catalítica do crude reacional obtido anteriormente obtendo-se o aminoéster 5.

2.2.1 Hidrogenação catalítica

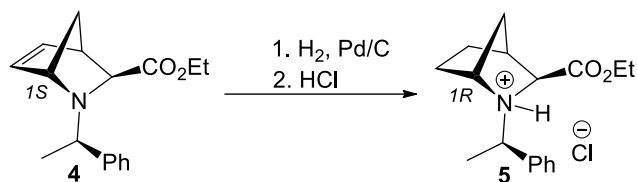
A hidrogenação é o tipo de reação química que ocorre quando uma molécula é obtida pela adição de hidrogénio a uma cadeia insaturada. Este processo é utilizado para reduzir ou saturar compostos orgânicos através da adição de um (ou mais) par(es) de átomos de hidrogénio a uma molécula, geralmente alcenos. Mas os alcenos não reagem com H_2 , uma vez que a barreira energética para a dissociação do hidrogénio molecular é muito elevada. A hidrogenação de uma ligação múltipla embora seja um processo exotérmico, não ocorre espontaneamente, nem mesmo a temperaturas elevadas.

Um exemplo é a dificuldade da hidrogenação do eteno a altas temperaturas ($200^\circ C$) por prolongados períodos de tempo, sem que se verifique a formação do correspondente alcano, o etano. Para alterar esta situação, recorre-se ao uso de catalisadores metálicos pois estes são capazes de baixar a energia de dissociação do hidrogénio molecular para que a reação ocorra. Os catalisadores geralmente são materiais insolúveis, criando suspensões no meio reacional. Os catalisadores de platina, paládio, ródio e rutério operam a baixas temperaturas e baixas pressões de H_2 , sendo considerados excelentes catalisadores. A principal função do catalisador é ativar o hidrogénio molecular para gerar hidrogénio ligado aos átomos metálicos, presentes na superfície do catalisador. Sem o metal, a clivagem térmica da ligação H-H seria energeticamente proibitiva. Os solventes normalmente utilizados neste tipo de reação são o metanol, etanol, ácido acético e acetato de etilo. A escolha de um catalisador depende da sua atividade e custo.

A hidrogenação catalítica apresenta elevada quimio-, regio- e estereosseletividade sob condições suaves, responsável pela redução de muitos grupos funcionais. Uma vantagem do uso de catalisadores heterogéneos em detrimento dos homogéneos é que os primeiros podem ser facilmente eliminados do meio reacional através de filtração, obtendo-se os compostos pretendidos sem contaminações por parte destes metais.

2.2.2 Resultados próprios

Para a síntese do aminoéster **5** procedeu-se à hidrogenação do crude reacional anterior onde se obtinha o aminoéster **4** e esta pode ser representada pela equação geral apresentada em baixo (Esquema 10).



Esquema 10 - Reação de hidrogenação do aminoéster **4** em meio ácido para obter o hidrocloreto **5**

Para tal utilizou-se Pd/C como catalisador em EtOH a uma pressão inicial de 50 bar de H₂. Após a reação procedeu-se à precipitação do aminoéster **5** através de uma mistura de Et₂O/PrOH (5:1) até precipitar cristais. Foi através deste procedimento de cristalização que o aminoéster pretendido foi isolado do outro diastereoisómero que se forma, conseguindo-se assim obter-se o prolinomimético **5** enantiomericamente puro e com a conformação desejada.

O rendimento global para a síntese do aminoéster **5** foi de 33% e este foi próximo do obtido na literatura.

A análise estrutural aminoéster **5** (**secção 4.2.1**) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos e foram concordantes com a literatura.

2.3 Síntese do aminoéster 6 (2-azabicyclo[2.2.1]heptano)

O passo final para se conseguir obter o prolinomimético desejado era a obtenção de uma amina secundária ao remover o grupo fenil presente no aminoéster **5** e para tal recorreu-se a uma reação de hidrogenólise.

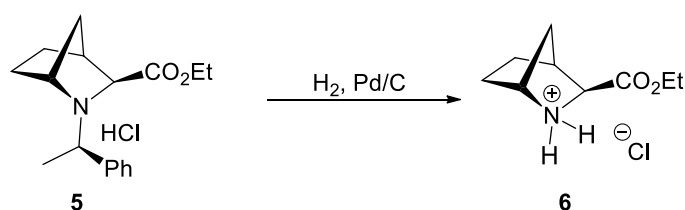
2.3.1 Hidrogenólise

A hidrogenólise refere-se à reação química em que se verifica a clivagem de uma ligação simples carbono-carbono, C-C, ou carbono-heteroátomo, C-X (X = O, N, S), pela adição de hidrogénio na presença de um catalisador metálico, com consequente formação de novas ligações C-H e H-X. O catalisador mais utilizado nesta reação é o paládio.

Este processo tem grande relevância no que diz respeito às X-desbenzilações. É muito utilizado em O-desbenzilações como método de desproteção do grupo Z (-OBn) em síntese peptídica e, ainda, em N-desbenzilações. Ainda que a N-desbenzilação ocorra com maior dificuldade do que a O-desbenzilação, este grupo de proteção aplicado a aminas reveste-se de grande utilidade em síntese orgânica, tendo sido aplicado a uma grande variedade de aminas que foram desprotegidas mediante condições suaves de hidrogenação catalítica com bons rendimentos, sem gerar quantidade apreciável de co-produtos.

2.3.2 Resultados próprios

A síntese do aminoéster **6** (2-azabicyclo[2.2.1]heptano) pode ser representada pela reação geral apresentada em baixo (Esquema 12).



Esquema 12 - Reação de hidrogenólise do aminoéster **5** para obter o sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano (**6**)

Para a síntese do 2-azabicyclo[2.2.1]heptano o último passo foi recorrer a uma hidrogenólise seguindo o procedimento descrito na literatura. O aminoéster **5** foi hidrogenado na presença de 5% Pd/C em EtOH a uma pressão de 15 bar de H₂. Após 4 dias obteve-se a amina secundária pretendida com um rendimento de 90%, conseguindo-se assim obter o prolinomimético desejado para a síntese dos análogos de GPE e PLG.

A análise estrutural aminoéster **5** (**secção 4.2.2**) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos e, mais uma vez, foram concordantes com a literatura. Era importante caracterizar-se estes compostos, mesmo que já estejam descrito, uma vez que, este era o ponto fulcral para a síntese dos peptidomiméticos pretendidos.

Parte II: Síntese dos derivados de GPE usando 2-azanorbornano

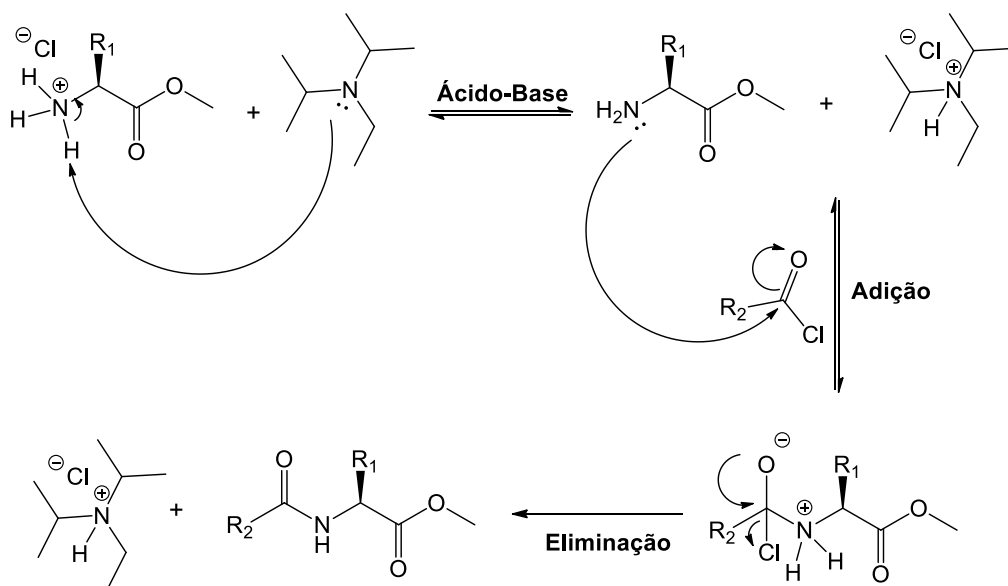
2.4 Síntese dos aminoácidos gordos 9w,x

Para se conseguir obter análogos lipofílicos de GPE o primeiro passo foi a adição da cadeia hidrocarbonada de 12C ao aminoácido glicina ou alanina (**9w** e **9x**, respetivamente) por uma reação de condensação usando o cloreto de lauroilo.

2.4.1 Reação de condensação

Os cloretos de acilo são derivados de ácidos carboxílicos e quando estes reagem com uma amina formam uma amida e o mecanismo desta reação de condensação está apresentada no Esquema 13.

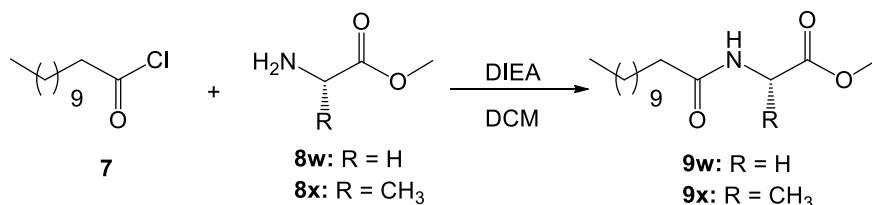
O aminoácido está em forma de sal (hidrocloreto) por isso o primeiro passo é adicionar DIEA para assim aumentar a sua solubilidade ao promover a desprotonação da amina. Assim o passo seguinte é o ataque nucleófilo da amina ao carbono do grupo carbonilo do cloreto de acilo, formando o correspondente intermediário tetraédrico. Este, por sua vez, é instável e por isso ocorre a eliminação do cloreto, como grupo de saída, formando assim a ligação amida. O cloreto que é eliminado ainda é atacado pela DIEA formando assim um sal que, posteriormente, é facilmente eliminado por extrações líquido-líquido.



Esquema 13 - Mecanismo de reação de condensação entre um cloreto de acilo e uma amina para a formação de uma amida

2.4.2 Resultados próprios

A síntese dos aminoácidos **9w,x** pode ser representada pela reação geral apresentada em baixo (Esquema 20).



Esquema 15 - Reação de condensação entre o cloreto de lauroílo (**7**) e os aminoácidos **8w,x** para obter os aminoácidos gordos **9w,x**

Para a síntese dos aminoácidos gordos **9w** e **9x** partiu-se da glicina e L-alanina sob a forma de ésteres metílicos. Para ajudar a dissolução adicionou-se a base DIEA e por fim o cloreto de lauroílo. É importante referir o papel importante da DIEA neste tipo de reação, é uma base terciária que irá aumentar a solubilidade do composto ao promover a desprotonação da amina, ativa o cloreto de acilo ao promover o ataque da amina e ainda tem como função sequestrar o HCl formado.

No final da reação, procedeu-se ao tratamento corrente de extrações líquido-líquido com DCM e solução saturada de NaHCO₃.

Os resultados obtidos para a síntese dos aminoácidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados obtidos para a síntese dos aminoácidos gordos **9w,x**

Composto	R	Rendimento (%)
9w	H	99,6
9x	CH ₃	95,0

Perante os resultados obtidos pode-se verificar que a obtenção dos diferentes produtos foi bastante satisfatória uma vez que os rendimentos das reações foram altos, sem a necessidade de purificação por técnicas cromatográficas.

A análise estrutural dos aminoácidos **9w** (**secção 4.3.1.**) e **9x** (**secção 4.3.9.**) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise dos espetros de ¹H-RMN obtidos foi facilmente identificado o grupo amida (CONH) com a presença de um singleto a campos baixos em ambos os espetros. Identificou-se diversos sinais relativos a cada aminoácido e foram distinguidos

pela identificação do grupo $-\text{CH}_3$ do resíduo L-alanina ($\text{H}_{\text{Ala-3}}$) e pelo grupo $-\text{CH}_2$ da glicina identificados por ambas as análises estruturais. Verificou-se que a reação ocorreu com sucesso uma vez que foi possível verificar-se a presença da cadeia hidrocarbonada de 12C em ambos os aminoácidos $((\text{CH}_2)_8)$ pela presença de um sinal com grande intensidade e que integrava para 16H nos espectros de ^1H -RMN. O grupo $-\text{CH}_3$ final da cadeia $((\text{CH}_2)_8\text{CH}_3)$ foi facilmente identificado através da presença de um tripleto a campos altos presente nos espectros. O sinal relativo ao éster metílico também foi facilmente identificado pela presença de um singleto a campos baixos. Estes dois últimos sinais também foram identificados pela análise estrutural de ^{13}C -RMN e DEPT. Através desta análise estrutural ainda foi possível identificar os carbonos quaternários dos grupos CO presentes nas moléculas mas por terem desvios químicos muito próximos não se distinguiu o tipo de ligação (ácido carboxílico ou amida).

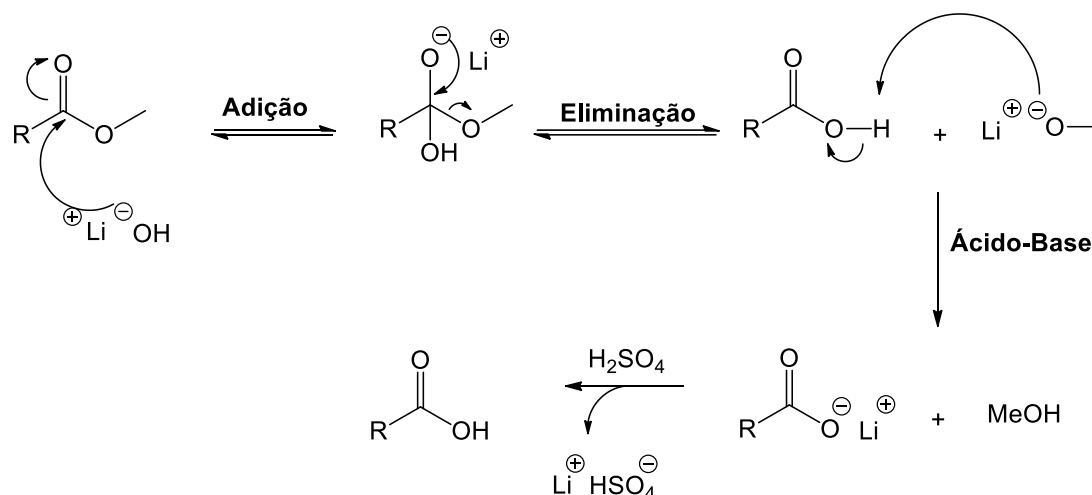
2.5 Síntese dos aminoácidos 10w,x

O grupo carboxílico dos aminoácidos gordos **9w,x** estavam protegidos por um grupo éster metílico e o passo seguinte era a remoção deste mesmo grupo e para tal recorreu-se à reação de hidrólise alcalina.

2.5.1 Hidrólise alcalina

Uma hidrólise alcalina é utilizada para obter o grupo carboxilato quando este está protegido como éster. Segundo o mecanismo representado no Esquema 22, a reação envolve o ataque direto pelo anião hidroxilo ao átomo de carbono do grupo carbonilo para formar um intermediário tetraédrico (adição). Este passo inicial é reversível pois tanto pode haver a eliminação do grupo hidroxilo, obtendo-se assim o produto de partida, como se formar o ácido carboxílico com a expulsão do respetivo alcóxido.

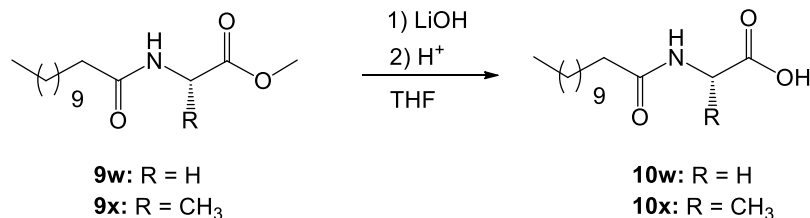
Mesmo assim este processo envolve a perda de um mau grupo de saída (eliminação). Após a eliminação, há formação do ácido carboxílico e do alcóxido correspondente, que incorre numa reação de ácido-base para formar o carboxilato de lítio e o álcool (MeOH). Este passo é responsável por conduzir a reação à completude. Posteriormente, é necessário proceder-se ao tratamento com uma solução aquosa ácida para originar o ácido carboxílico desejado.



Esquema 17 - Mecanismo de reação de uma hidrólise alcalina para obtenção de um ácido carboxílico a partir de um éster

2.5.2 Resultados próprios

Para a síntese dos aminoácidos **10w,x** recorreu-se a uma reação de hidrólise alcalina e esta pode ser representada pela equação geral apresentada em baixo (Esquema 19).



Esquema 19 - Reação de hidrólise alcalina dos aminoácidos gordos 9w,x para obter o respetivo ácido carboxílico (10w,x)

Para a síntese dos aminoácidos **10w,x**, inicialmente, os aminoácidos protegidos (**9w,x**) foram dissolvidos numa mistura de THF/H₂O. Tendo em conta que o THF é solúvel em H₂O, acaba por possibilitar o encontro das espécies orgânicas com o LiOH, aumentando a velocidade de reação. Escolheu-se LiOH como base a ser utilizada uma vez que apresenta uma basicidade baixa, ou seja, doa mais dificilmente o seu grupo hidroxilo e assim permite uma hidrólise de ésteres mais lenta e seletiva (diminuindo a incidência de epimerização). No final da reação adicionou-se H₂SO₄ 1M para protonar o composto e obter-se assim o ácido carboxílico pretendido.

Os resultados obtidos para a síntese dos aminoácidos **10w,x** estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos para a síntese dos aminoácidos **10w,x**

Composto	R	Rendimento (%)
10w	H	81,0
10x	CH ₃	95,0

Perante os resultados obtidos pode-se verificar que a obtenção dos diferentes produtos foi bastante satisfatória uma vez que os rendimentos das reações foram altos sem ser necessário recorrer à purificação por coluna cromatográfica.

A análise estrutural dos aminoácidos **10w** (**secção 4.3.2.**) e **10x** (**secção 4.3.10.**) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise dos espectros de ¹H-RMN obtidos foi facilmente identificado o grupo amida (CONH) com a presença de um singleto a campos baixos em ambos os espectros. Distinguiu-se os aminoácidos pela identificação do grupo -CH₃ do resíduo L-alanina (H_{Ala-3}) e pelo grupo -CH₂ da glicina, identificados por ambas as análises estruturais. Também foi possível comprovar a presença da cadeia hidrocarbonada de 12C em ambos os péptidos ((CH₂)₈) e ainda é facilmente identificado o grupo CH₃ presente nessa mesma cadeia ((CH₂)₈CH₃). Para mostrar a diferença dos espectros de ¹H-RMN dos aminoácidos gordos 9w,x e 10w,x está representado na Figura 27 os espectros dos compostos 9w e 10w e no primeiro verifica-se a presença do singleto correspondente ao grupo éster metílico e no segundo verifica-se o desaparecimento deste sinal, como seria de esperar, mas surge um singleto correspondente ao grupo OH do respetivo ácido carboxílico. Nos espectros de ¹³C-RMN e DEPT também se verifica que o grupo éster metilo não aparece comprovando, mais uma vez, que a reação ocorreu com sucesso. Através da análise dos espectros de ¹³C-RMN e DEPT foi possível identificar os carbonos quaternários dos grupos CO presentes nas moléculas mas por terem desvios químicos muito próximos não se distinguiu o tipo de ligação (ácido carboxílico ou amida).

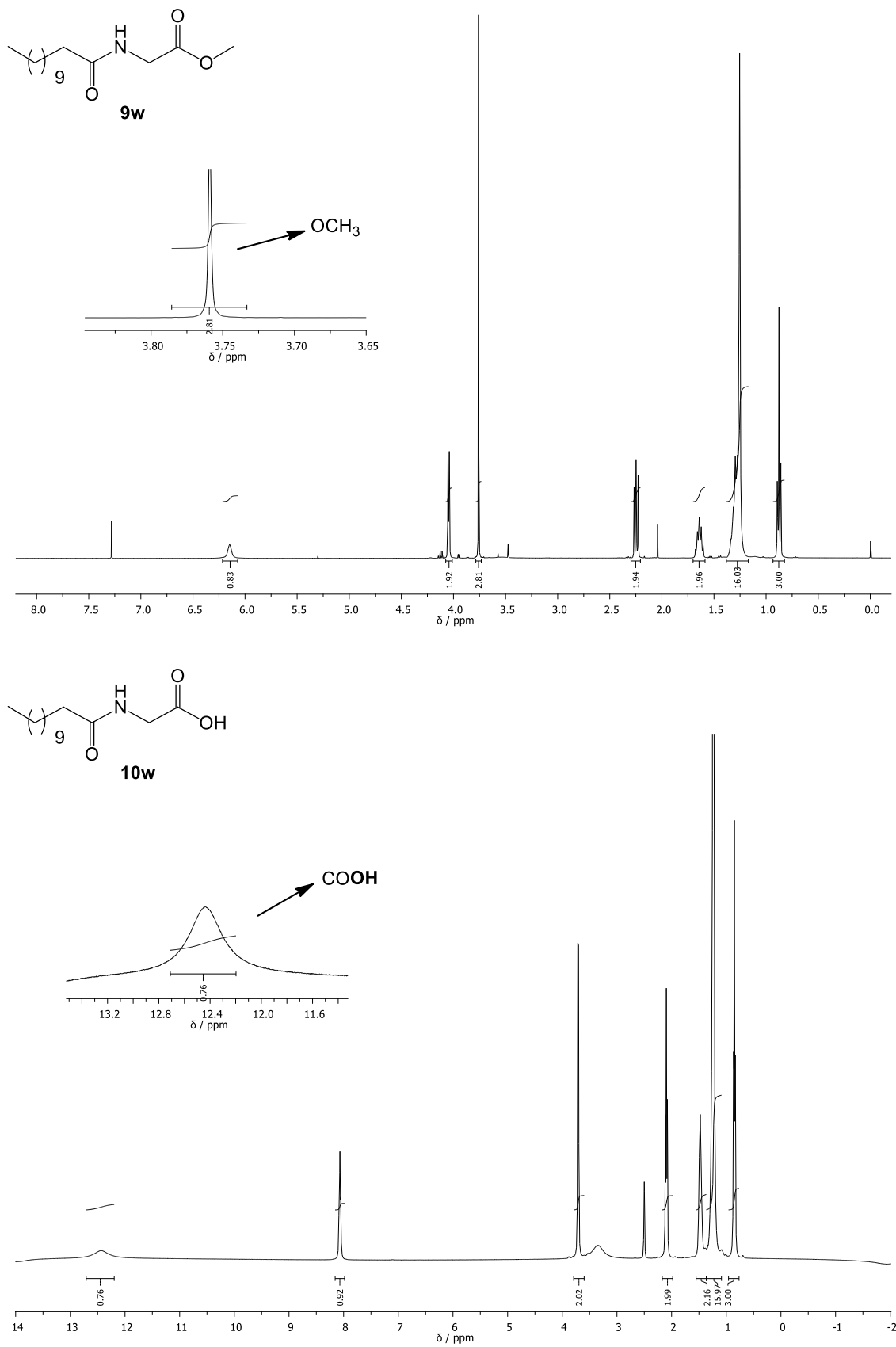


Figura 27 – Espectro de ^1H -RMN do aminoácido gordo **9w**, em cima, com expansão do singlete correspondente ao grupo éster metílico e do espectro de ^1H -RMN do aminoácido gordo **10w** com expansão do grupo OH do ácido carboxílico

2.6 Síntese dos dipéptidos 11w,x

Após a reação de hidrólise alcalina já era possível acoplar cada aminoácido ao prolinomimético sintetizado anteriormente (aminoéster **6**) através de uma reação de acoplamento obtendo-se, assim, os dipéptidos **11w** e **11x**.

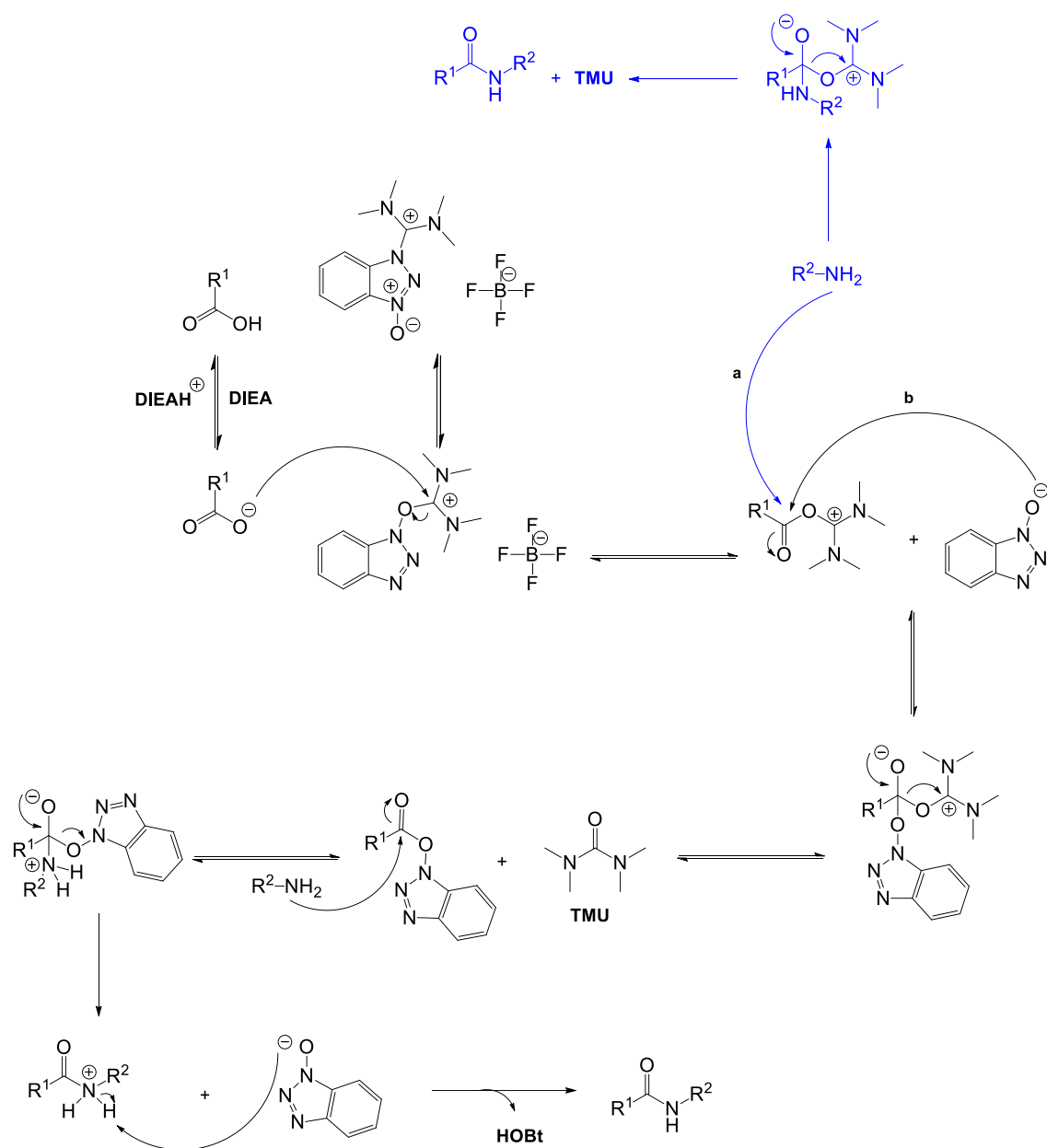
2.6.1 Reações de acoplamento

Os procedimentos utilizados para combinar dois resíduos de aminoácidos para formar um péptido são designados por métodos de acoplamento. As reações de acoplamento envolvem ataque nucleofílico pelo átomo de azoto do grupo amino de um α -aminoácido ao carbono eletrofílico do grupo carbonilo de outro α -aminoácido ativado pela introdução de um grupo electroatraidor.

Para permitir esse ataque nucleofílico é necessário que o grupo carboxílico seja ativado, previamente, e para tal é necessário utilizar-se um agente de acoplamento para esse fim. Estes agentes dão origem a intermediários como cloretos de ácido, anidridos ou ésteres ativados. Um dos tipos de agentes de acoplamento conhecidos são os sais de urónio como é o caso do **GBTU** (hexafluorofosfato de *O*-benzotriazol-1-il-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio) e do **TBTU** (tetrafluorborato de *O*-benzotriazolitetrametilurónio).

No caso da síntese dos dipéptidos e dos tripéptidos deste trabalho escolheu-se o TBTU como agente de acoplamento, este é o agente mais utilizado na síntese de péptidos devido, principalmente, à sua estabilidade durante o armazenamento. O TBTU não reage com ácidos carboxílicos mas sim com os correspondentes carboxilatos. É necessário, portanto, desprotonar o ácido carboxílico, previamente, usando para tal uma base, sendo neste caso a amina terciária DIEA.

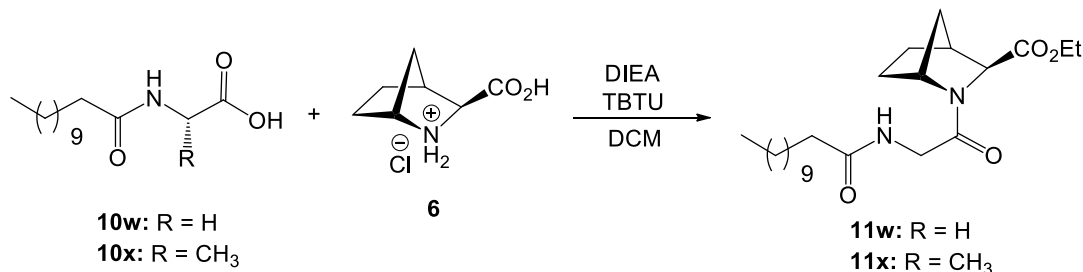
Segundo o mecanismo apresentado no Esquema 20, numa reação de acoplamento usando TBTU, após a dissolução do ácido carboxílico com DCM anidro, adiciona-se DIEA em excesso com o objetivo de remover o próton lábil do mesmo formando o anião carboxilato correspondente. Após a sua formação, este ataca rapidamente o TBTU originando o intermediário aciloxicarbénico que é aminolizado (**a**) ou convertido em éster benzotriazolito (**b**). Ambos os intermediários são mais reativos do que o ácido carboxílico inicial pois são mais eletrófilos e por possuírem um melhor grupo de saída. Por fim, adiciona-se a amina promovendo o ataque nucleófilo do átomo azoto do grupo amino ao grupo carbonilo, de ambos os intermediários que se podem formar, originando, assim, uma ligação peptídica ou amida. Como é possível verificar no Esquema 9, os produtos que se formam nesta reação são 1-hidroxibenzotriazole, **HOBt**, e tetrametilureia (**TMU**). No caso da tetrametilureia esta é facilmente eliminada por extrações líquido-líquido por ser hidrossolúvel.



Esquema 20- Mecanismo condensação peptídica usando TBTU como agente de acoplamento

2.6.2 Resultados próprios

Para se obter os dipéptidos **11w,z** recorreu-se a uma reação de acoplamento usando o TBTU como agente de acoplamento e a sua síntese pode ser representada pela equação geral apresentada em baixo (Esquema 21).



Esquema 21 - Reação de acoplamento peptídico entre o biciclo **6** e os aminoácidos **10w,x**

Para a síntese dos dipéptidos derivados dos GPE foi realizada a adição espaçada dos diferentes reagentes, para tentar garantir a formação dos intermediários, e teve-se sempre em consideração a ordem de cada um pois é crucial para o sucesso da reação. Assim sendo, após se dissolver o aminoácido em DCM anidro, num sistema purgado, previamente com Ar, adicionou-se primeiro DIEA e deixou-se a mistura em agitação durante 30 minutos e só depois se adicionou o TBTU. O último aminoácido sob a forma de amina livre foi adicionada 1 hora após a adição do TBTU.

No final das reações procedeu-se a extrações líquido-líquido com solução saturada de NaHCO₃ de forma a eliminar o excesso de DIEA e de produtos secundários hidrossolúveis como é o caso da tetrametilureia. Por fim, procedeu-se ao isolamento do composto pretendido recorrendo à purificação por coluna cromatográfica usando AcOEt ou Hex/AcOEt como eluentes.

Os resultados obtidos para a síntese dos dipéptidos derivados do GPE estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos para os dipéptidos **11w,x** derivados do GPE

Composto	R	Rendimento (%)
11w	H	70,0
11x	CH ₃	63,6

Para otimizar os rendimentos podia-se alterar o tempo de espaçamento de adição de cada reagente para garantir com mais certeza que os intermediários se formariam.

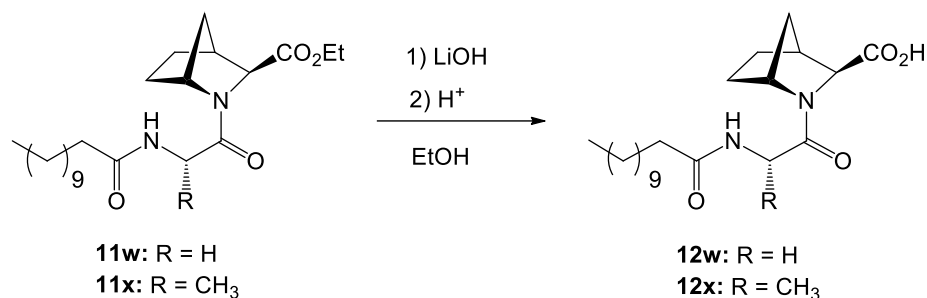
A análise estrutural dos dipéptidos **11w** (secção 4.3.3.) e **11x** (secção 4.3.11.) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e, por

espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise dos espectros de ^1H -RMN obtidos foi facilmente identificado a amida (CONH) presente no biciclo com a presença de um singlete a campos baixos em ambos os espectros. Identificou-se alguns picos caraterísticos do biciclo, por ambas as análises estruturais, como são os casos dos prótons H-1 e H-4 e a presença destes sinais prova que a reação de acoplamento entre os aminoácidos e o biciclo ocorreu com sucesso. É difícil identificar todos os picos do biciclo pois estes estão sobrepostos com outros e pela presença de rotameros nos espectros de ^1H -RMN. Comprovou-se a presença da cadeia hidrocarbonada de 12C em ambos os péptidos $((\text{CH}_2)_8)$ e ainda é facilmente identificado o grupo CH_3 presente nessa mesma cadeia $((\text{CH}_2)_8\text{CH}_3)$ através da presença de um tripleto a campos altos. É ainda possível distinguir os péptidos pela identificação do grupo $-\text{CH}_3$ do resíduo L-alanina ($\text{H}_{\text{Ala-3}}$). Estes dois últimos picos também foram identificados pela análise de ^{13}C -RMN e DEPT. Através da análise dos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT foi possível identificar os carbonos quaternários dos grupos CO presentes nas moléculas mas por terem desvios químicos muito próximos não se distinguiu o tipo de ligação (éster ou amida). Provou-se a presença do grupo éster etílico pela identificação dos seus grupos CH_2 e CH_3 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) tanto por ^1H -RMN como ^{13}C -RMN e DEPT.

2.7 Síntese dos dipéptidos 12w,y

O grupo carboxílico dos dipéptidos **11w,y** estavam protegidos por um grupo etilo e o passo seguinte era remove-lo e para tal para recorreu-se a uma hidrólise alcalina. A síntese dos dipéptidos **12w** e **12y** pode ser representada pela reação geral apresentada em baixo (Esquema 24).



Esquema 24 - Reação de hidrólise alcalina dos dipéptidos 11w,y para obter o respetivo ácido carboxílico (12w,x)

Recorreu-se a uma hidrólise alcalina usando como base LiOH e o mecanismo desta reação já foi explicado anteriormente (**secção 2.5.1**).

Seguiu-se o procedimento descrito anteriormente (**secção 2.5.2**) a única diferença foi o solvente utilizado para dissolver os compostos iniciais, nestas reações utilizou-se EtOH uma vez que é o grupo de saída do composto inicial e adicionou-se, posteriormente, LiOH em excesso e controlou-se o desenvolvimento da reação por CCF. Após a reação terminar realizou-se o tratamento corrente de forma a se obter o ácido carboxílico pretendido.

Os resultados obtidos para a síntese dos dipéptidos **12w,x** derivados do GPE estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados obtidos para os dipéptidos **12w,x**

Composto	R	Rendimento (%)
12w	H	94,7
12x	CH ₃	94,1

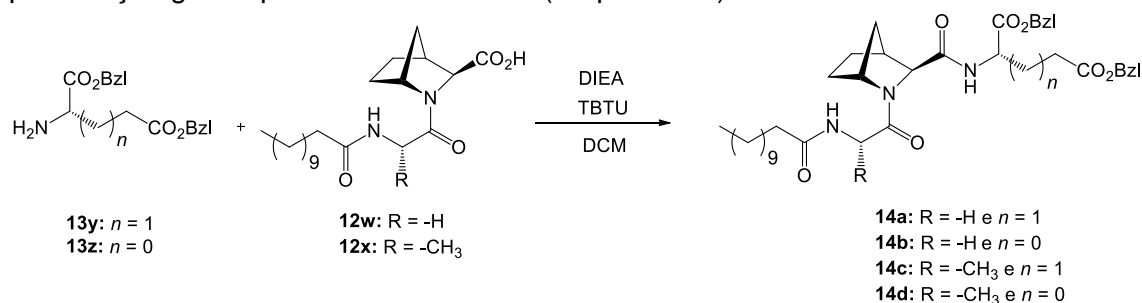
Nestas reações não foi necessário isolar o produto através de cromatografia em coluna, ou seja, a purificação do produto foi realizada somente por extrações líquido-líquido.

A análise estrutural dos dipéptidos **12w** (**secção 4.3.4.**) e **12x** (**secção 4.3.14.**) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise dos espectros de ^1H -RMN obtidos foi facilmente identificado o grupo amida (CONH) pela presença de um singlete a campos baixos em ambos os espectros. Nesta análise verifica-se que a reação ocorreu com sucesso uma vez que surge um singlete característicos do próton OH do ácido carboxílico a campos baixos nos espectros de ^1H -RMN e o pico do grupo éster não está presente em ambas as análises. Também foi possível identificar alguns picos característicos do biciclo como são os casos dos H1, H3 e H4. Comprovou-se a presença da cadeia hidrocarbonada de 12C em ambos os dipéptidos ($(\text{CH}_2)_8$) e ainda é facilmente identificado o grupo CH_3 presente nessa mesma cadeia ($(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$) através da presença de um tripleto a campos altos. É ainda possível distinguir os péptidos pela identificação do grupo $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ do resíduo L-alanina ($\text{H}_{\text{Ala-2}}$ e $\text{H}_{\text{Ala-3}}$, respetivamente). Estes dois sinais também são identificados pela análise de ^{13}C -RMN e DEPT. Através desta análise estrutural dos espectros foi possível identificar os carbonos quaternários dos grupos CO presentes nas moléculas.

2.8 Síntese dos tripéptidos 14a-d

Após a remoção do grupo éster etílico dos dipéptidos já era possível realizar-se a última reação de acoplamento com o último aminoácido, sendo que este estava protegido pelo grupo benzilo. A síntese dos tripéptidos protegidos pode ser representada pela reação geral apresentada em baixo (Esquema 25).



Esquema 25 - Reação de acoplamento peptídico entre os aminoácidos **13y,z** e os dipéptidos **12w,x** para obter os tripéptidos **14a-d**

Para a obtenção destes tripéptidos recorreu-se ao acoplamento usando como agente de acoplamento o TBTU, o mecanismo desta reação já foi explicado anteriormente (**secção 2.6.1**).

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente (**secção 2.6.2**) tendo sempre em consideração a ordem e o tempo de adição de cada reagente para tentar que os intermediários se formassem, controlando sempre as reações por CCF. Realizou-se o tratamento corrente e purificou-se os produtos da reação recorrendo à cromatografia em coluna.

Os resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos protegidos **14a-d** derivados do GPE estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados obtidos para os tripéptidos protegidos **14a-d** derivados do GPE

Composto	R	<i>n</i>	Rendimento (%)
14a	H	1	73,7
14b	H	0	59,4
14c	CH ₃	1	73,7
14d	CH ₃	0	65,2

Perante os resultados obtidos verifica-se que a reação de acoplamento realizada para os derivados com glutamato (**14b** e **14d**) são os que apresentam rendimentos superiores e isto pode ser influenciado pela própria estrutura deste composto uma vez que uma cadeia maior permite um menor impedimento estereoquímico.

A análise estrutural dos tripéptidos **14a** (secção 4.3.5.), **14b** (secção 4.3.7.), **14c** (secção 4.3.13) e **15d** (secção 4.3.15) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, COSY, HMQC e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise dos espetros de ¹H-RMN obtidos foi facilmente identificado o grupo protetor em todos os produtos pela presença de um multipeto na zona aromática compatível com a presença dos anéis aromáticos do grupo protetor (OBzl) e ainda os seus grupos CH₂. Como exemplo, na Figura 29 está representado uma parte do espectro de ¹H-RMN do tripéptido **14a**, em que se verifica a presença do multipeto na zona aromática e os sinais característicos do grupo CH₂ do grupo protetor (OBzl). Este grupo também é identificado através da análise dos espetros de ¹³C-RMN e DEPT pois também estão presente sinais na zona aromática. O grupo CONH também foi facilmente identificado em todos os espetros de ¹H-RMN com a presença de um singleto a campos baixos. Foi possível identificar alguns sinais característicos do biciclo, como é o caso dos H-4, H-1 e H-3 em ambas as análises estruturais realizadas. Também é possível comprovar a presença da cadeia hidrocarbonada de 12C em todos os tripéptidos ((CH₂)₈) e ainda é facilmente identificado o grupo CH₃ presente nessa mesma cadeia ((CH₂)₈CH₃). É ainda possível distinguir os péptidos pela identificação do grupo -CH₃ do resíduo L-alanina (H_{Ala}-3) assim como os prótons dos resíduos L-glutamato (H_{Glu}-2) e do L-aspartato (H_{Asp}-2).

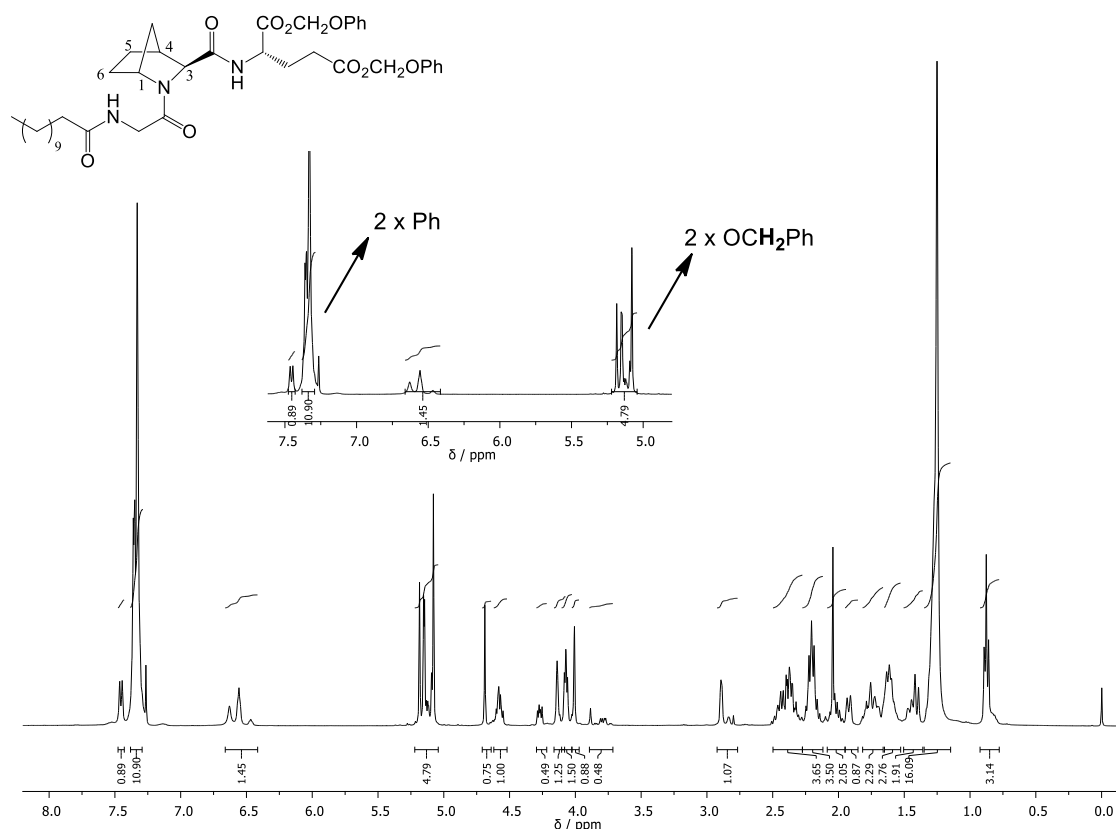
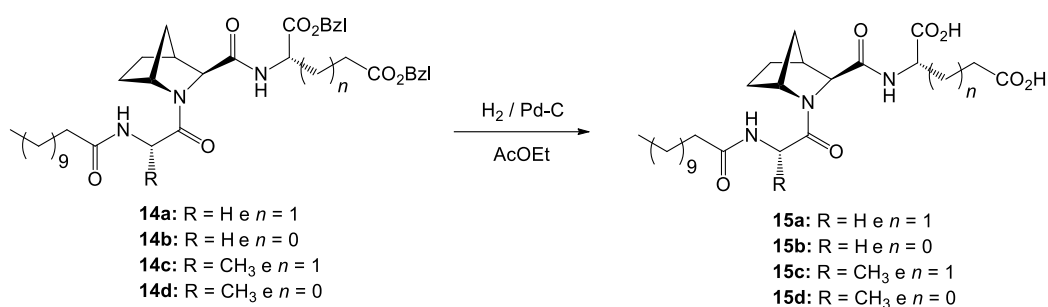


Figura 29 - Representação do espectro de ^1H -RMN do tripéptido **14a** com ampliação da zona aromática

Realizou-se análises bidimensionais (COSY e HMQC) para caracterizar os tripéptidos protegidos de forma a atribuir a correspondência entre os sinais dos prótons e os respectivos carbonos. Através da análise dos espectros de HMQC foi possível atribuir os diversos sinais dos diferentes carbonos. Foi possível distinguir os C-1, C_{Ala}-2 ou C_{Gly}-2, e C-3 e com os espectros de COSY ter a certeza dessa atribuição com a correlação dos C_{Ala}-2 ou C_{Gly}-2 com o grupo NH. A atribuição do C_{Ala}-2 também foi confirmada com a correlação com os prótons do grupo CH₃ da alanina. Também se atribuiu os carbonos C_{Glu}-2 e C_{Asp}-2 e verificou-se a sua correlação com o próton relativo ao grupo CONH pela análise do COSY. Na análise de HMQC é possível fazer a correlação entre os prótons aromáticos do grupo protetor (Ph) com os respectivos carbonos, presentes também na zona aromática, e, ainda, do grupo CH₂ presente nesse mesmo grupo.

2.9 Compostos finais: primeira família de derivados (15a-d)

Para se obter os tripéptidos pretendidos derivados do GPE o último passo era a remoção do grupo protetor (OBzl) recorrendo-se a uma reação de hidrogenólise. A síntese dos tripéptidos **15a-d** pode ser representada pela equação química geral apresentada em baixo (Esquema 27).



Esquema 27 - Reação de hidrogenólise dos tripéptidos 14a-d para obter os tripéptidos finais 15a-d

Para a síntese dos tripéptidos finais dissolveu-se os tripéptidos protegidos em AcOEt e adicionou-se o catalisador, ou seja, o Pd/C em quantidade catalítica. Posteriormente saturou-se o sistema com H₂ e deixou-se a mistura reacional em agitação magnética contínua à temperatura ambiente sob pressão atmosféricas de H₂, usando um balão de H₂, durante 4 horas.

No final da reação, removeu-se o catalisador por filtração com celite e extraiu-se o composto final com lavagens usando AcOEt e MeOH. Posteriormente eliminou-se o solvente por pressão reduzida e isolou-se, assim, o produto final sem ser necessário recorrer à purificação por cromatografia em coluna sendo uma vantagem desta reação e a principal razão por se ter seguido esta via sintética uma vez que o produto final era um ácido carboxílico e a purificação por cromatografia em coluna iria ser dificultada pela sua elevada polaridade. Após tratamento corrente (filtração em celite) os tripéptidos finais foram obtidos sem ser necessário recorrer à purificação por cromatografia em coluna sendo uma vantagens desta reação e a principal razão por se ter seguido esta via sintética.

Os resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos derivados do GPE **15a-d** estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos finais derivados do GPE

Composto	R	n	Rendimento (%)
15a	H	1	51,0
15b	H	0	71,5
15c	CH ₃	1	64,0
15d	CH ₃	0	75,8

Perante os resultados obtidos pode-se verificar que a obtenção dos diferentes produtos foi muito satisfatória uma vez que os rendimentos das reações foram

moderados tendo em conta que o produto é um ácido carboxílico e a sua extração era mais difícil pois tem uma polaridade elevada e fica facilmente retido.

A análise estrutural dos tripéptidos **15a** (secção 4.3.6.), **15b** (secção 4.3.8.), **15c** (secção 4.3.14) e **15d** (secção 4.3.16) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT, COSY, HMQC e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise dos espetros de ^1H -RMN obtidos verificou-se que o grupo protetor foi removido eficazmente em todos os tripéptidos, uma vez que o multipletto na zona aromática desapareceu assim como o grupo CH_2 do grupo benzilo em ambas as análises estruturais. O tripéptido **15a** foi o único solúvel em CDCl_3 daí ser o único espectro de ^1H -RMN onde se verifica a presença de um singletto característico do grupo OH do ácido carboxílico obtido como é possível verificar-se no espectro apresentado na Figura 31. Foi possível identificar alguns sinais característicos do biciclo, como é o caso dos H-4, H-1 e H-3. Também é possível comprovar a presença da cadeia hidrocarbonada de 12C em todos os tripéptidos $((\text{CH}_2)_8)$ e ainda é facilmente identificado o grupo CH_3 presente nessa mesma cadeia $((\text{CH}_2)_8\text{CH}_3)$. É ainda possível distinguir os péptidos pela identificação do grupo $-\text{CH}_3$ do resíduo L-alanina ($\text{H}_\text{A}-3$) e ainda pela identificação do grupo CH_2 dos tripéptidos com o resíduo aspartato ($\text{H}_\text{Asp}-3$) por ambas as análises estruturais realizadas. É de referir que a contante de acoplamento relativa ao tripleto do grupo CH_3 final da cadeia hidrocarbonada de 12C não sofreu grandes alterações ao longo das sínteses dos diversos compostos, esta manteve-se próxima de 6,8 Hz.

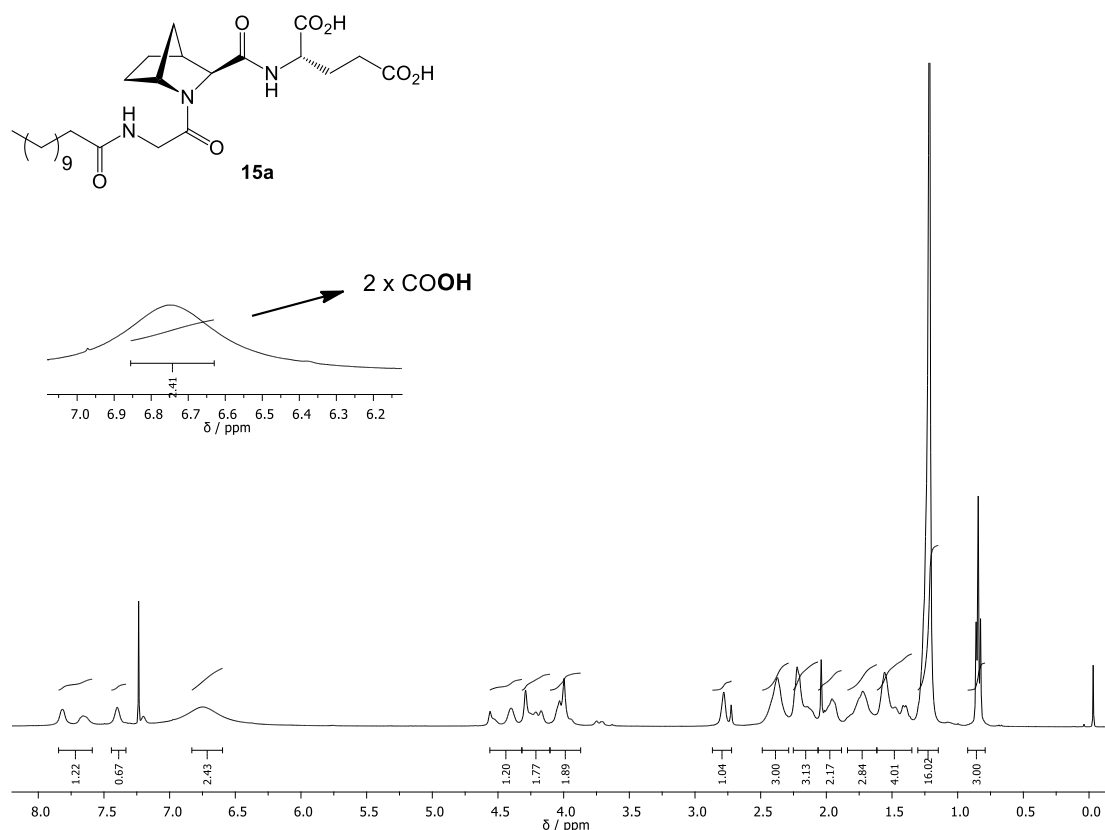


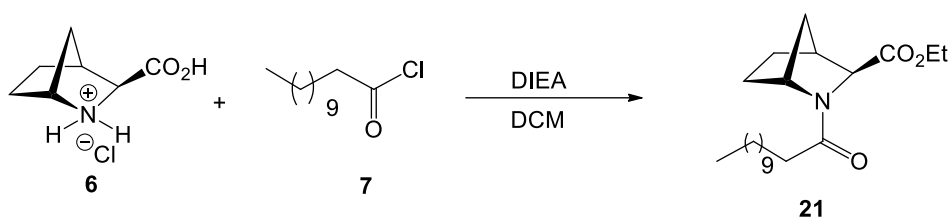
Figura 31- Espectro de ^1H -RMN do tripéptido **15a** com ampliação da zona do grupo do OH do correspondente ácido carboxílico

Realizou-se análises bidimensionais (COSY e HMQC) para caracterizar os tripéptidos e assim conseguiu-se atribuir a correspondência entre os sinais dos prótons e os respectivos carbonos. Através da análise dos espectros de HMQC foi possível atribuir os diversos sinais dos diferentes carbonos com mais precisão. Foi possível distinguir os C-1, C_{Ala}-2 ou C_{Gly}-2, e C-3 mas com alguma dificuldade por apresentarem muitos rotâmeros. A atribuição do C_{Ala}-2 foi confirmada com os espectros de COSY onde se verifica a correlação do respetivo próton com os prótons do grupo CH₃ da alanina. Foi possível identificar o grupo CH dos resíduos L-aspartato (C_{Asp}-2) e L-glutamato (C_{Glu}-2) por correlação os prótons correspondentes através da análise dos espectros de COSY. Sem este tipo de análises não se conseguia uma atribuição dos prótons e dos respectivos carbonos com tanta certeza e foi uma forma de ter uma caracterização completa dos tripéptidos finais derivados do GPE.

Parte II: Síntese dos derivados de PLG usando 2-azanorbornano

2.10 Síntese do aminoácido 21

Após a síntese dos análogos derivados do GPE, seguiu-se para a síntese dos derivados de PLG. Para tal iniciou-se esta síntese pela adição da cadeia hidrocarbonada de 12C ao prolinomimético 2-azabornano através de uma reação de substituição nucleofílica. Assim sendo, a síntese do aminoácido **21** pode ser representada pela equação química geral apresentada em baixo (Esquema 28).



Esquema 28 - Reação de condensação entre o biciclo **6** e o cloreto de lauroílo (**7**) para obter o aminoácido **21**

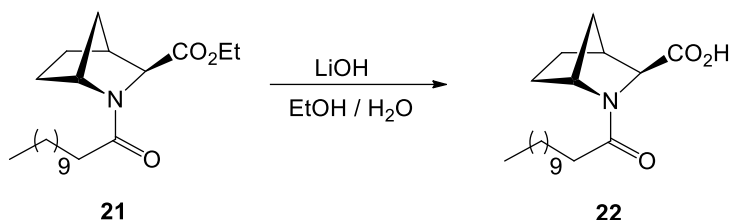
Para a síntese do aminoácido lipofílico **21** recorreu-se a reação de condensação usando um cloreto de acilo, neste caso o cloreto de lauroílo (**7**). O mecanismo desta reação já foi explicada anteriormente (**secção 2.4.1**).

Para a síntese do aminoácido **21** seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente (**secção 2.4.1**) e o rendimento da reação foi de 96%.

A análise estrutural aminoácido **21** (**secção 4.4.1**) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada para este composto. Foi possível comprovar que a reação ocorreu com sucesso uma vez que se identificou a cadeia hidrocarbonada de 12C ((CH₂)₈) e o grupo CH₃ final através da presença de um tripleto a campos altos no espectro de ¹H-RMN.

2.11 Síntese do aminoácido 22

O grupo carboxílico do aminoácido **21** estava protegido por um grupo éster etílico e o passo seguinte era, portanto, remove-lo e para tal recorreu-se a uma hidrólise alcalina. A síntese do aminoácido **22** pode ser representada pela equação química geral apresentada em baixo.



Esquema 30 - Reação de hidrólise alcalina do aminoácido **21** para obter o aminoácido **22**

Recorreu-se a uma hidrólise alcalina usando como base LiOH e o mecanismo desta reação já foi explicado anteriormente (**secção 2.5.1**).

Seguiu-se o procedimento descrito anteriormente (**secção 2.5.2**) a única diferença foi o solvente utilizado para dissolver o composto inicial, nesta reação utilizou-se EtOH uma vez que é o grupo de saída do composto inicial e adicionou-se, posteriormente, LiOH em excesso e controlou-se o desenvolvimento da reação por CCF. Após a reação terminar realizou-se o tratamento corrente de forma a se obter o ácido carboxílico pretendido. O rendimento obtido nesta reação foi de 77,15%.

A análise estrutural aminoácido **22** (**secção 4.4.2**) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS.

Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada para este composto. Através da análise do espectro de ^1H -RMN obtido foi facilmente identificado o grupo OH relativo ao ácido carboxílico através de um singlete a campos baixos provando assim que a reação ocorreu com sucesso como é possível se verificar na Figura 22.

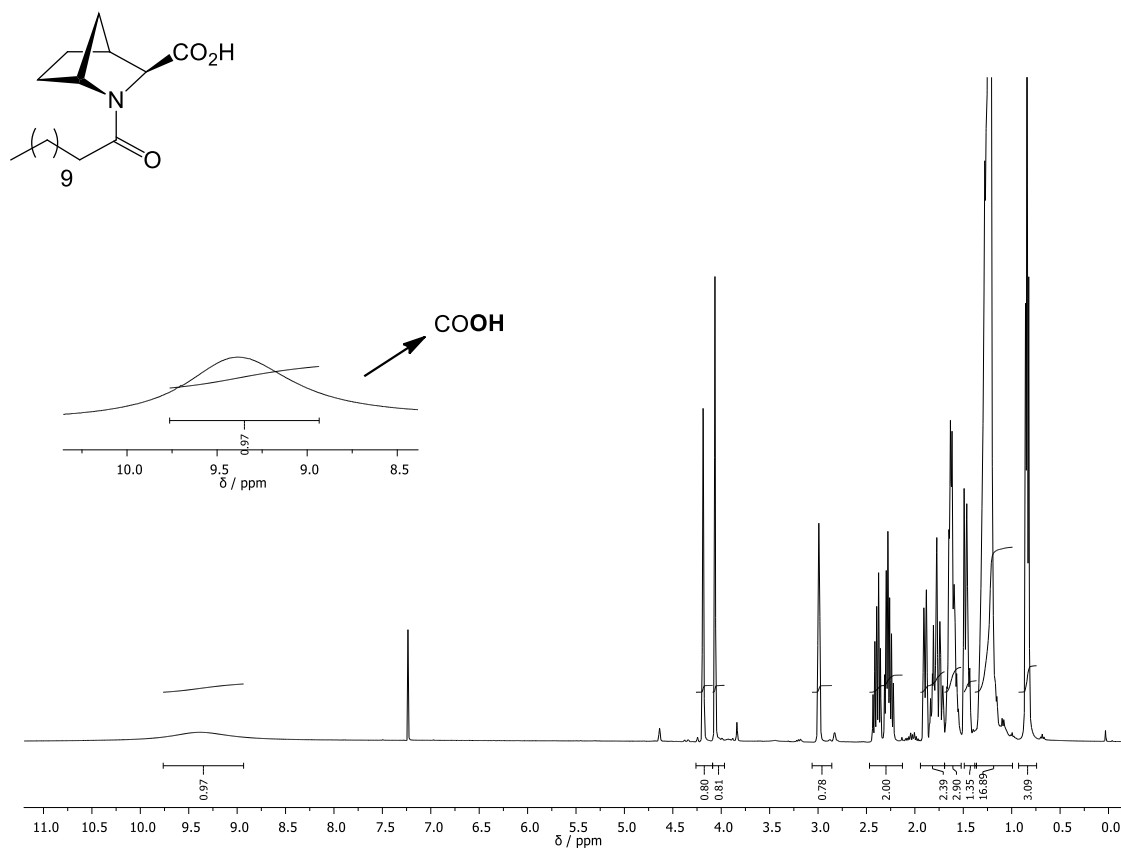
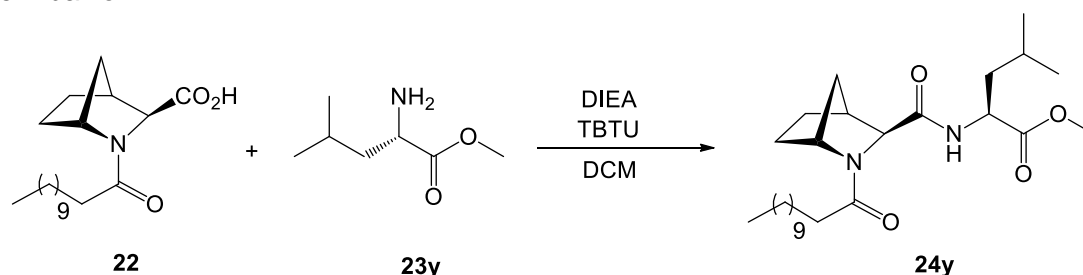


Figura 34 - Espectro do aminoácido **28** com ampliação da zona do grupo OH correspondente ao ácido carboxílico

2.12 Síntese do dipéptido 24y

Após a reação de hidrólise alcalina já era possível realizar-se a primeira reação de acoplamento com o aminoácido leucina obtendo-se, assim, o dipéptido **24y**. A síntese deste dipéptido pode ser representada pela equação química geral apresentada em baixo.



Esquema 32 - Reação de acoplamento peptídico entre o aminoácido **22** e o aminoácido **23y** para obter o dipéptido **24y**

Para a obtenção do dipéptido **24y** recorreu-se a uma reação de acoplamento usando como agente de acoplamento o TBTU, o mecanismo desta reação já foi explicado anteriormente (**secção 2.6.1**). O objetivo desta reação era acoplar o aminoácido **28** sintetizado anteriormente a outro aminoácido, neste caso a leucina esterificada.

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente (**secção 2.6.2**) tendo sempre em consideração a ordem e o tempo de adição de cada reagente para tentar que os intermediários se formassem, controlando sempre a reação por CCF. Realizou-se o tratamento corrente e purificou-se o produto da reação recorrendo à cromatografia em coluna e o rendimento da reação foi de 77,18%.

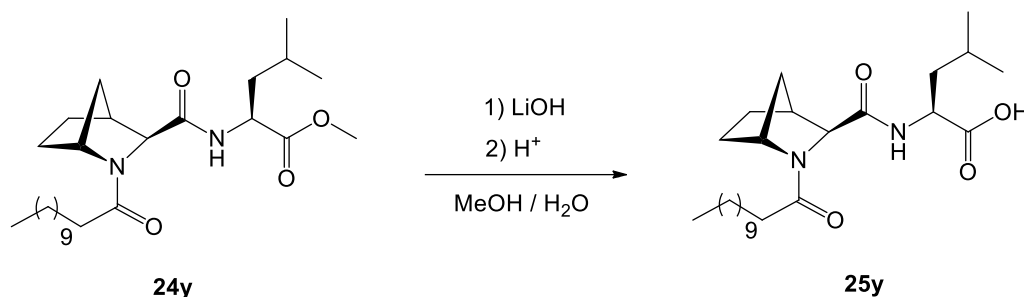
A obtenção do dipéptido **30** foi satisfatória uma vez que o rendimento da reação foi relativamente alto.

A análise estrutural dos dipéptido **24y** (**secção 4.4.3**) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS.

Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada para o composto. Foi possível identificar sinais específicos do resíduo leucina como foi o caso do próton $\text{H}_{\text{Leu-2}}$ e dos dois grupos CH_3 ($\text{H}_{\text{Leu-5}}$). Este grupo foi facilmente identificado pela presença de um sinal a campos altos que integrava para 9 pois também estava sobreposto com o grupo CH_3 ligado à cadeia hidrocarbonada. Pela análise de ^{13}C -RMN e DEPT os carbonos correspondentes do aminoácido leucina adicionado também foram identificados. A presença destes sinais mostra que a reação ocorreu com sucesso.

2.13 Síntese do dipéptido 25y

Mais uma vez o grupo carbonilo estava protegido por um grupo éster metílico e para o remover de forma a obter o respetivo ácido carboxílico recorreu-se, novamente, a uma hidrólise alcalina. A síntese do dipéptido **25y** pode ser representada pela equação química geral apresentada em baixo (Esquema 34).



Esquema 34 - Reação de hidrólise alcalina do dipéptido **24y** para obter o respetivo ácido carboxílico (**25y**)

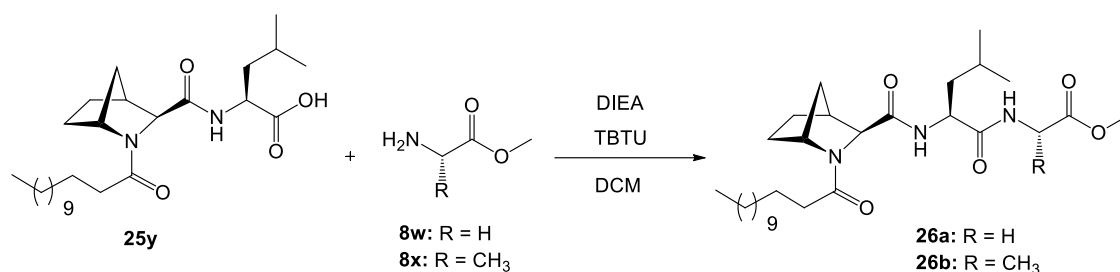
Recorreu-se a uma hidrólise alcalina usando como base LiOH e o mecanismo desta reação já foi explicado anteriormente (**secção 2.4.1**).

Seguiu-se o procedimento descrito anteriormente (**secção 2.4.2**) a única diferença foi o solvente utilizado para dissolver o composto inicial, nestas reações utilizou-se MeOH uma vez que é o grupo de saída do composto inicial e adicionou-se, posteriormente, LiOH em excesso e controlou-se o desenvolvimento da reação por CCF. Após a reação terminar realizou-se o tratamento corrente de forma a se obter o ácido carboxílico pretendido com um rendimento de 78,1 %.

A análise estrutural dos dipéptido **25y** (**secção 4.4.4.**) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada para o composto. Pela análise estrutural de ^1H -RMN identificou-se o grupo OH relativo ao ácido carboxílico mostrando que a reação ocorreu com sucesso.

2.14 Síntese dos tripéptidos 26a e 26b

Uma vez obtido o ácido carboxílico o composto **25y** foi sujeito a acoplamento peptídico para a introdução do último aminoácido (glicina ou alanina). A síntese dos tripéptidos **26a** e **26b** pode ser representada pela equação química geral apresentada em baixo (Esquema 36).



Esquema 36 - Reação de acoplamento peptídico entre o dipéptido **25y** e os aminoácidos **8w,x** para obter os tripéptidos **26a** e **26b**

Para a obtenção destes tripéptidos recorreu-se a uma reação de acoplamento usando como agente de acoplamento o TBTU, o mecanismo desta reação já foi explicado anteriormente (**secção 2.6.1**). O objetivo desta reação era acoplar um dipéptido com um aminoácido esterificado, sendo a glicina ou a alanina.

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente (**secção 2.6.2**) tendo sempre em consideração a ordem e o tempo de adição de cada reagente para tentar que os intermediários se formassem, controlando sempre as reações por CCF. Realizou-se o tratamento corrente e purificou-se os produtos da reação recorrendo á cromatografia em coluna de gel de SiO₂.

Os resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos **26a** e **26b** derivados do PLG estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos **26a** e **26b** derivados de PLG

Composto	R	Rendimento (%)
26a	H	70,0
26b	CH ₃	72,5

Perante os resultados obtidos pode-se verificar que a obtenção dos diferentes produtos foi satisfatória uma vez que os rendimentos das reações foram relativamente altos e próximos com os obtidos nas reações de acoplamento anteriores.

A análise estrutural dos tripéptidos **26a** (**secção 4.4.5.**) e **26b** (**secção 4.4.7**) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, COSY, HMQC e,

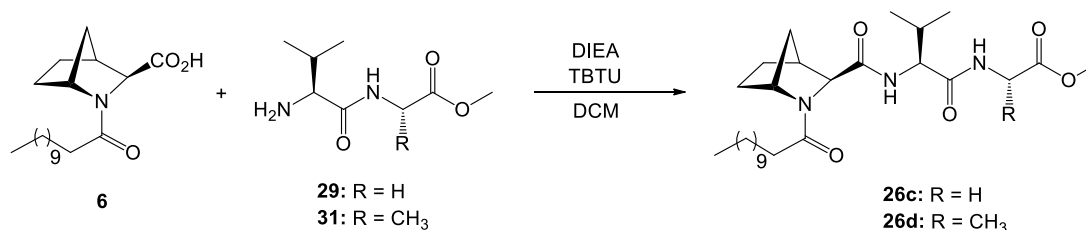
por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise do espectro de ^1H -RMN obtido foi facilmente identificado o grupo amida (CONH) pela presença de um singlete a campos baixos. Comparando com os espectros da síntese do dipéptido **25y**, surgiram mais sinais e estes são relativos aos aminoácidos adicionados, glicina (tripéptido **26a**) e alanina (tripéptido **26b**), mostrando que a reação de acoplamento ocorreu com sucesso. Esses sinais permitiram distinguir os tripéptidos por identificação do grupo CH_2 do resíduo L-glicina e do grupo CH e CH_3 do resíduo L-alanina. Foi possível identificar alguns picos característicos do biciclo como são os casos dos sinais H1, H3 e H4 em ambas as análises estruturais realizadas. Para provar também a estrutura do composto foi identificado sinais específicos do resíduo leucina como foi o caso do próton $\text{H}_{\text{Leu-2}}$ e dos dois grupos CH_3 ($\text{H}_{\text{Leu-5}}$). Este grupo foi facilmente identificado nos espectros de ^1H -RMN pela presença de um sinal a campos altos que integrava para 9 prótons pois também estava sobreposto com o grupo CH_3 ligado à cadeia hidrocarbonada (6 + 3 prótons). Comprovou-se, também, a presença da cadeia hidrocarbonada de 12C ($(\text{CH}_2)_8$). Por fim o sinal relativo ao grupo CH_3 do éster metílico que estava ligado aos aminoácidos adicionados foi identificado em ambas análises estruturais realizadas (CO_2CH_3).

Realizou-se análises bidimensionais (COSY e HMQC) para caracterizar os tripéptidos protegidos de forma atribuir a correspondência entre os sinais dos prótons e os respectivos carbonos. Através da análise dos espectros de HMQC foi possível atribuir os diversos sinais dos diferentes carbonos com mais precisão. Foi possível distinguir os C-1, $\text{C}_{\text{Ala-2}}$ ou $\text{C}_{\text{Gly-2}}$, e C-3 e com os espectros de COSY ter a certeza dessa atribuição com a correlação dos $\text{C}_{\text{Ala-2}}$ ou $\text{C}_{\text{Gly-2}}$ com o grupo CONH. A atribuição do $\text{C}_{\text{A-2}}$ também foi confirmada com a correlação do respectivo próton com os prótons do grupo CH_3 da alanina. Também se atribuiu os carbonos $\text{C}_{\text{Leu-2}}$ e $\text{C}_{\text{Val-2}}$ e a correlação com os respectivos prótons foi possível através da análise do COSY mas o mesmo não aconteceu com o próton $\text{H}_{\text{Leu-4}}$ uma vez que nessa região do espectro tem muitos sinais sobrepostas. Sem este tipo de análises não se conseguia uma atribuição dos prótons e dos respectivos carbonos com tanta certeza. Através da análise de HMQC ainda se confirmou a atribuição do grupo éster metílico (OCH_3).

2.15 Síntese dos tripéptidos 26c e 26d

Para a síntese dos derivados contendo valina no resíduo central optou-se por uma via de síntese convergente uma vez que se possui os dipéptidos necessários. Para o efeito o prolinomimético **6** foi acoplado com os dipéptidos terminais como esta representado no Esquema 39.

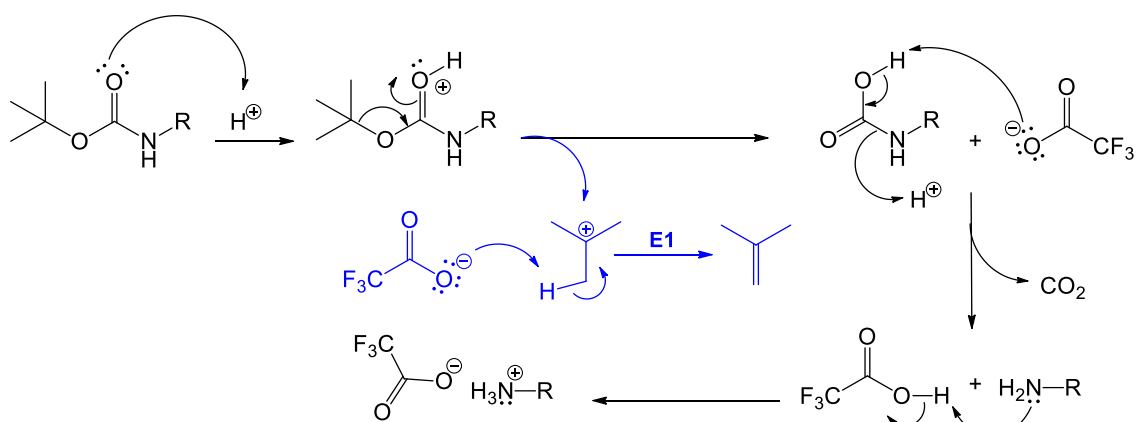


Esquema 39 - Reação de acoplamento peptídico entre o aminoácido **6** e os dipéptidos **29** e **31** para obter os tripéptidos **26b** e **26d**

Previamente foi necessário desproteger os dipéptidos **28** e **30** para assim obter-se as aminas livres (dipéptidos **29** e **31**).

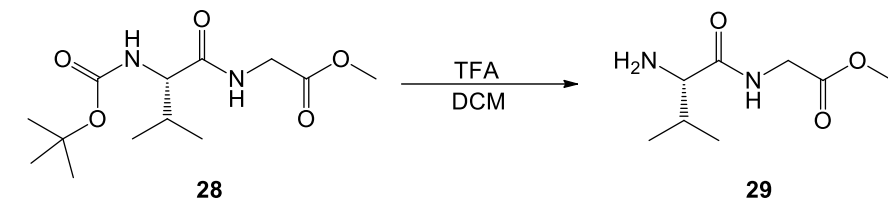
2.15.1 Desproteção do dipéptido 28

O dipéptido **28** estava protegido no grupo amina pelo grupo protetor *tert*-butoxicarbonilo (BOC). Este grupo é sensível a ácidos portanto para desproteger este grupo recorre-se a um tratamento com ácidos fortes sendo o ácido trifluoracético (TFA) o mais utilizado devido à rapidez e seletividade do mesmo. Esta reação de desproteção está representado no Esquema 40. Inicialmente ocorre protonação do oxigénio do grupo carbonilo. Posteriormente ocorre fragmentação libertando o catião *tert*-butil. Este catião sofre rearranjo e forma o isobuteno (E1). Por fim há libertação de CO₂ e obtêm-se o grupo amina desprotegido. Como os subprodutos formados são gases (CO₂) o tratamento desta reação acaba por ser facilitada.



Esquema 40 - Mecanismo reacional da desproteção ácida do grupo protetor *tert*-butoxicarbonilo

A síntese dos dipéptido **29** pode, portanto, ser representada pela equação química geral apresentada em baixo (Esquema 47)



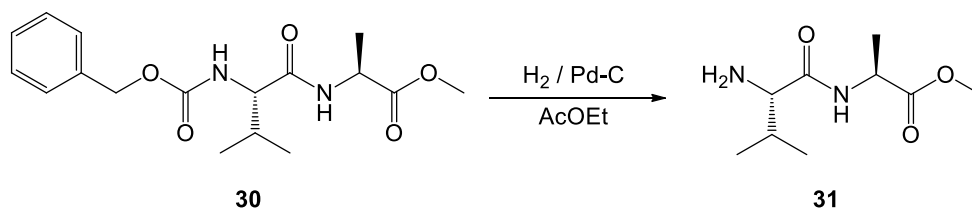
Esquema 42 - Reação de desproteção do dipéptido 28 para a obtenção do dipéptido 29

No final da reação, eliminou-se o solvente por pressão reduzida e para eliminar o excesso de TFA coevaporou-se com DCM. Obteve-se assim o composto pretendido, não sendo necessário recorrer a cromatografia em coluna para purificar o mesmo, sendo uma das vantagens desta reação. O rendimento desta reação foi de 80%.

A análise estrutural do dipéptido **29** (**secção 4.4.9.**) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT, e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada para o composto. O grupo protetor removido possuía 9 prótons relativos ao grupo t_{BU} e como não aparece nenhum singlete relativo a esse sinal no espectro de ^1H -RMN significa que a reação de desproteção acídica ocorreu com sucesso e conseguiu-se obter o dipéptido desprotegido com o grupo amina livre da L-valina. Ainda foi possível identificar tanto prótons como carbonos característicos dos aminoácidos presentes (valina e glicina).

2.15.2 Desproteção do dipéptido 30

Neste caso o grupo protetor do grupo amina era o grupo benzilo e para o remover recorreu-se a uma reação de hidrogenólise. A síntese do dipéptido **31** pode ser representada pela equação química geral apresentada em baixo (Esquema 43).



Esquema 43 - Reação de hidrogenólise do dipéptido 30 para obter o dipéptido 31

Recorreu-se a uma reação de hidrogenólise tendo sido explicada anteriormente (**secção 2.3.1**).

O grupo benzilo também pode ser utilizado como grupo protetor de um grupo amina e para o remover seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente (**secção 2.3.2**) para desproteger um grupo carboxílico, usando como catalisador Pd/C

e sob pressão atmosférica de H_2 controlando por CCF. Realizou-se o tratamento corrente e removeu-se o catalisador por filtração com celite e o rendimento obtido foi de 71,3 %

A análise estrutural do dipéptido **31** (**secção 4.4.12**) foi realizada mediante espectroscopia de 1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT, e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada para o composto. Pela análise do espectro de 1H -RMN verificou-se que não aparece nenhum multiplete na zona aromática o que significa que a hidrogenólise ocorreu com sucesso e conseguiu-se obter o dipéptido desprotegido no grupo amida da valina. Ainda se identificou tanto prótons como carbonos característicos dos dois aminoácidos presentes (L-valina e L alanina).

2.15.3 Reação de acoplamento para obter os tripéptidos **26c** e **26d**

Para a obtenção destes tripéptidos recorreu-se a uma reação de acoplamento usando como agente de acoplamento o TBTU entre cada dipéptido desprotegido previamente e o prolinomimético **6** como já tinha referido anteriormente. O mecanismo desta reação já foi explicado anteriormente (**secção 2.1.1**).

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente (**secção 2.1.1**). Realizou-se o tratamento corrente e purificou-se os produtos da reação recorrendo à cromatografia em coluna.

Os resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos **26c** e **26d** derivados do PLG estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos protegidos **26c** e **26d**

Composto	R	Rendimento (%)
26c	H	77,3
26d	CH ₃	72,8

Perante os resultados obtidos pode-se verificar que a obtenção dos diferentes produtos foi satisfatória uma vez que os rendimentos das reações foram relativamente altos.

A análise estrutural dos tripéptidos **26c** (**secção 4.4.10.**) e **26d** (**secção 4.4.13**) foi realizada mediante espectroscopia de 1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT, COSY, HMQC e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise do espetro de 1H -RMN obtido foi facilmente identificado os dois grupos amida (CONH) pela presença de dois singletos a campos baixos. Foi

possível identificar alguns picos característicos do biciclo como são os casos dos prótons H1, H3 e H4. É difícil identificar todos os picos do biciclo pois estes estão sobrepostos com outros e pela presença de rotâmeros. O facto de ser possível verificar-se que o biciclo está presente mostra que a reação de acoplamento ocorreu com sucesso. Identificou-se sinais relativos ao resíduo L-valina como foi o caso do H_{V-2} e dos dois grupos CH₃ (H_{Val-4}). Este grupo foi facilmente identificado pela presença de um sinal a campos altos que integrava para 9 prótons pois também estava sobreposto com o grupo CH₃ ligado à cadeia hidrocarbonada (6 + 3 prótons). Foi possível ainda identificar sinais dos resíduos alanina e glicina. O sinal relativo ao grupo CH₃ do éster metílico que estava ligado aos aminoácidos adicionados foi identificado (CO₂CH₃) em ambas as análises estruturais realizadas. Comprovou-se, também, a presença da cadeia hidrocarbonada de 12C ((CH₂)₈). Através da análise dos espectros de ¹³C-RMN e DEPT foi possível identificar os carbonos quaternários dos grupos CO presentes nos diferentes tripéptidos.

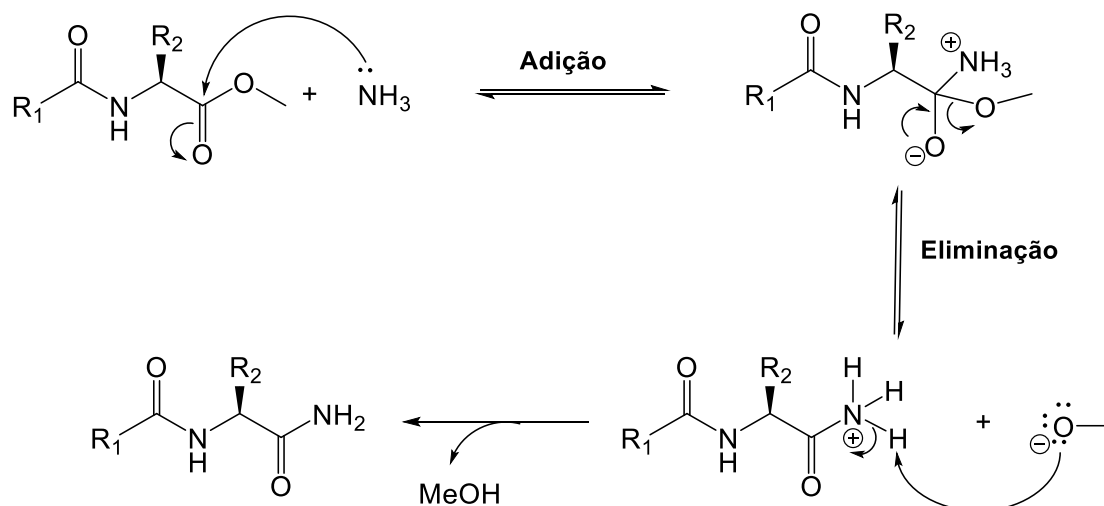
Realizou-se análises bidimensionais (COSY e HMQC) para caracterizar os tripéptidos protegidos de forma atribuir a correspondência entre os sinais dos prótons e os respetivos carbonos. Foi possível distinguir os C-1, C_{Ala-2} ou C_{Gly-2}, e C-3 e com os espectros de COSY ter a certeza dessa atribuição com a correlação dos C_{Ala-2} ou C_{Gly-2} com o grupo CONH. A atribuição do H_{Ala-2} também foi confirmada com a correlação do respetivo próton com os prótons do grupo CH₃ da alanina. Também se atribuiu os carbonos C_{Val-2} e C_{Val-3} e a correlação com os respetivos prótons através da análise do espectro de HMQC e é possível confirmar pelo COSY um vez que aparece a correlação entre ambos os prótons, como era suposto.

2.16 Compostos finais: segunda família (27a-d)

O grupo terminal do PLG é uma amida primária e, portanto, para se obter os análogos finais derivados deste tripéptido o último passo era obter esse mesmo grupo e para tal recorreu-se a uma reação de aminólise.

2.16.1 Aminólise

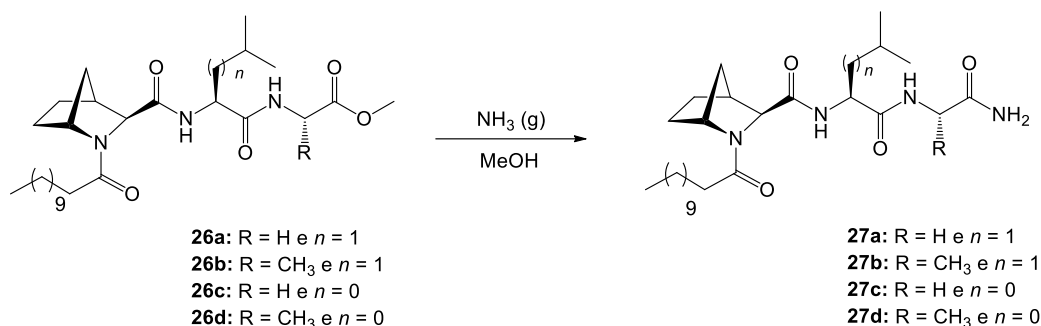
A reação de aminólise é uma reação que permite obter uma amida a partir de um derivado de ácido carboxílico. O mecanismo da reação está representado no Esquema 45. Neste tipo de reação existe uma adição e posterior eliminação. Inicialmente, ocorre um ataque nucleofílico do amoníaco ao grupo carbonilo, formando um intermediário tetraédrico. Posteriormente há eliminação do grupo de saída metanolato e, por fim, há formação de metanol e o produto final pretendido, uma amida.



Esquema 45 - Mecanismo reacional de obtenção de uma amida primária usando corrente de amoníaco em metanol

2.16.2 Resultados próprios

A síntese dos tripéptidos **27a-d** pode ser representada pela equação química geral apresentada em baixo (Esquema 47).



Esquema 47 - Reação de aminólise dos tripéptidos 26a-d para obter os tripéptidos 27a-d

Os resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos finais **27a-d** derivados do PLG estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos finais **27a-d** derivados do PLG

Composto	R	n	Rendimento (%)
27a	H	1	69,0
27b	CH ₃	1	80,0
27c	H	0	83,0
27d	CH ₃	0	87,0

Perante os resultados obtidos pode-se verificar que se obteve os compostos desejados com bons rendimentos, somente o tripéptido **27a** é que apresenta um rendimento mais baixo, sem necessidade de recorrer a técnicas cromatográficas.

A análise estrutural dos tripéptidos finais derivados do PLG **27a** (secção 4.4.6), **27b** (secção 4.4.8), **27c** (secção 4.4.11) e **27d** (secção 4.4.14) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, COSY, HMQC e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise do espectro de ¹H-RMN obtido foi facilmente identificado o grupo CONH pela presença de um singleto a campos baixos. Foi possível identificar alguns picos caraterísticos do biciclo como são os casos dos H1, H3 e H4. Verificou-se a presença de sinais relativos aos resíduos L-alanina e glicina. Para provar a estrutura do composto verificou-se que o sinal relativo ao grupo CH₃ do éster metílico não se encontra em todos os espectros mostrando que a reação ocorreu com sucesso. Foi

identificado sinais específicos do resíduo valina e leucina dos dois grupos CH_3 tanto $\text{H}_{\text{Leu-5}}$ como $\text{H}_{\text{Val-4}}$. Por fim, comprovou-se, também, a presença da cadeia hidrocarbonada de $12\text{C } ((\text{CH}_2)_8)$.

Realizou-se análises bidimensionais (COSY e HMQC) para caracterizar os tripéptidos protegidos de forma atribuir a correspondência entre os sinais dos prótons e os respectivos carbonos. Foi possível distinguir os C-1, CAla-2 ou CGly-2, e C-3 e com os espectros de COSY ter a certeza dessa atribuição com a correlação dos CAla-2 ou CGly-2 com o grupo NH. A atribuição do CAla-2 também foi confirmada com a correlação do respectivo próton com os prótons do grupo CH_3 da alanina. Também se atribuiu os carbonos da L-valina e L-leucina (CVal-2, CVal-3, CLeu-3, CLeu-4) e a correlação com os respectivos prótons através da análise do espectro de HMQC e é possível confirmar pelo COSY um vez que aparece a correlação entre ambos os prótons, como era suposto. Sem este tipo de análises não se conseguia uma atribuição dos prótons e dos respectivos carbonos com tanta certeza e foi a melhor forma de fazer uma caracterização completa a estes tripéptidos finais

Parte III: Síntese dos derivados de GPE usando 4-hidroxirolina (trabalho adicional)

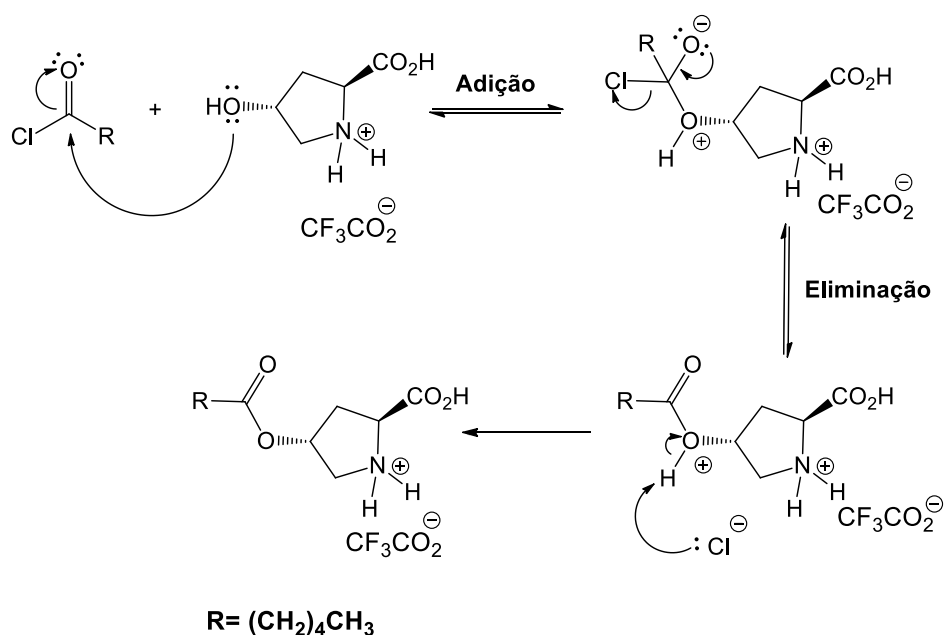
2.17 Síntese do aminoácido 18

Após a síntese dos análogos de GPE lipofílicos com uma cadeia hidrocarbonada de 12C onde o prolinomimético era o 2-azanorbornano, ainda houve tempo para desenvolver novos análogos. Estes análogos foram sintetizados a partir da 4-hidroxirolina e, para manter a coerência do trabalho, estes também tinham um caráter lipofílico mas a cadeia gorda adicionada foi de somente 6C. Não se manteve a cadeia de 12C uma vez que no grupo de investigação já os estavam a desenvolver por isso escolheu-se o número médio para, posteriormente, se conseguir fazer uma análise comparativa. Para a síntese destes novos análogos inicialmente adicionou-se essa mesma cadeia através de uma reação de O-acilação.

2.17.1 Reação de O-acilação

Uma reação de O-acilação engloba todas as reações em que um grupo derivado de um ácido carboxílico é introduzido num composto orgânico. O derivado do ácido carboxílico mais utilizado é o halogeneto de acilo, mais concretamente um cloreto de acilo, devido ao facto de ser bastante reativo e por isso bastante eletrófilo o que permite ser atacado muito facilmente e ainda por possuir um bom grupo de saída, o cloreto, o que facilita a reação.

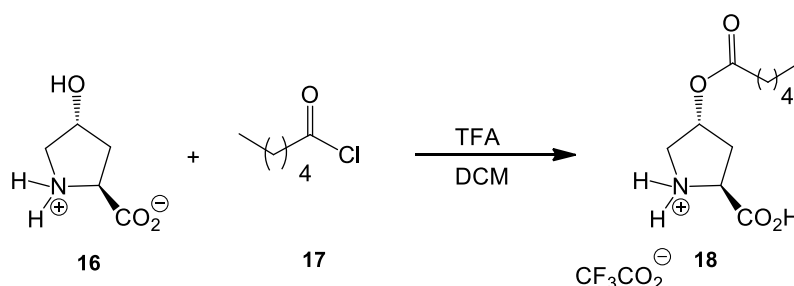
No Esquema 48 está representado o mecanismo da reação de O-acilação. Este mecanismo consiste numa reação de adição obtendo-se um intermediário tetraédrico e, de seguida, ocorre uma reação de eliminação, com a expulsão do anião cloreto, obtendo-se o produto desejado. É importante que o composto inicial (4-hidroxirolina) esteja totalmente protonado, ou seja, tanto o ácido carboxílico como a amina estejam totalmente protonados pois assim a amina deixa de ser nucleofílica não prejudicando a reação pretendida, garantindo-se, assim, o ataque por parte do grupo hidroxilo.



Esquema 48 - Mecanismo reacional da reação de O-acilação de forma a obter um éster

2.17.2 Resultados próprios

O composto **18** foi sintetizado seguindo o procedimento descrito na literatura⁷² e a equação química geral pode ser apresentada em baixo (Esquema 49).



Esquema 49 - Reação de O-acilação entre 4-hidroxiprolina (**16**) e o cloreto de hexanoílo (**17**) para obter o aminoácido **18**

O ácido utilizado nesta reação de O-acilação foi o TFA. O TFA ($\text{pK}_a = 0,23$) é um ácido análogo ao ácido acético ($\text{pK}_a = 4,75$) mas mais forte que este. O TFA funciona como catalisador, uma vez que irá tornar o carbono do grupo carbonilo do cloreto de acilo ainda mais eletrófilo facilitando o ataque nucleofílico por parte do grupo hidroxilo da 4-hidroxiprolina. Adicionalmente, o ambiente ácido proporcionado pelo TFA garante que a amina fica protonada, suprimindo a sua reatividade, evitando deste modo, reações indesejadas (formação da ligação amida). O rendimento desta reação de O-acilação foi de 66%, um rendimento próximo do obtido pela literatura.

A análise estrutural do aminoácido **18** (**secção 4.3.17**) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e DEPT e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos

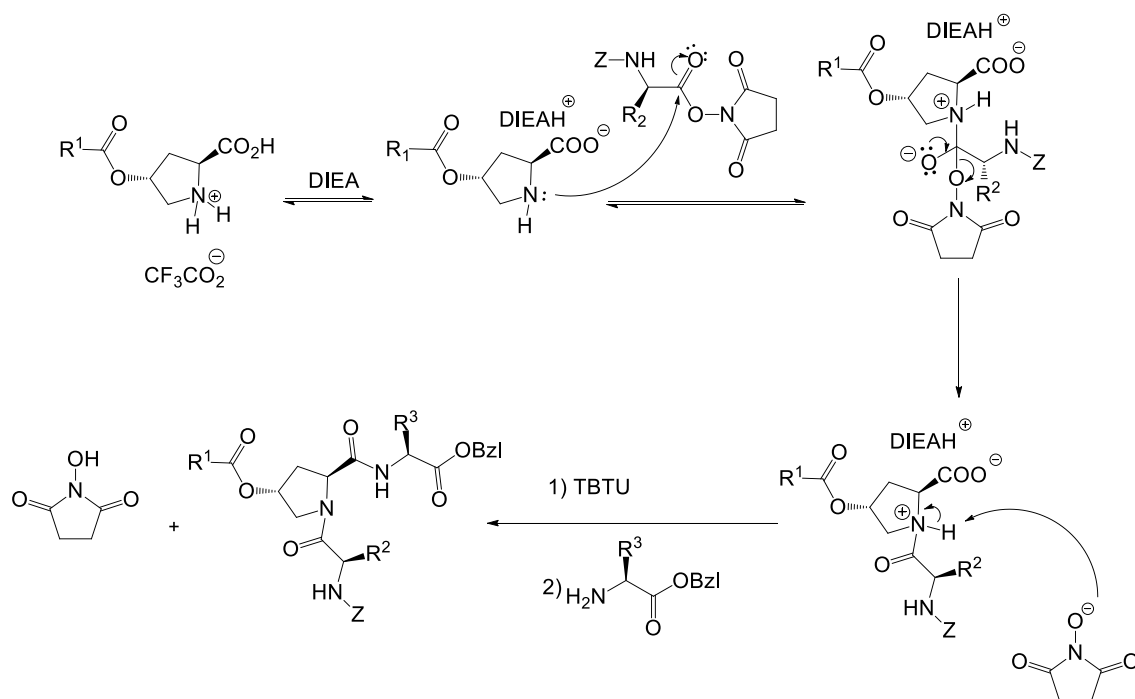
tendo sido possível identificar os prótons e carbonos da prolina e ainda a cadeia hidrocarbonada de 6C adicionada.

2.18 Síntese dos tripéptidos 19a-d

Para a síntese destes novos derivados de GPE o grupo de investigação desenvolveu um novo método que permite um acoplamento duplo por uma reação *one pot* onde permitiu a síntese dos tripéptidos **19a-d** através de uma única reação de acoplamento.

2.18.1 Síntese de tripéptidos *one-pot*

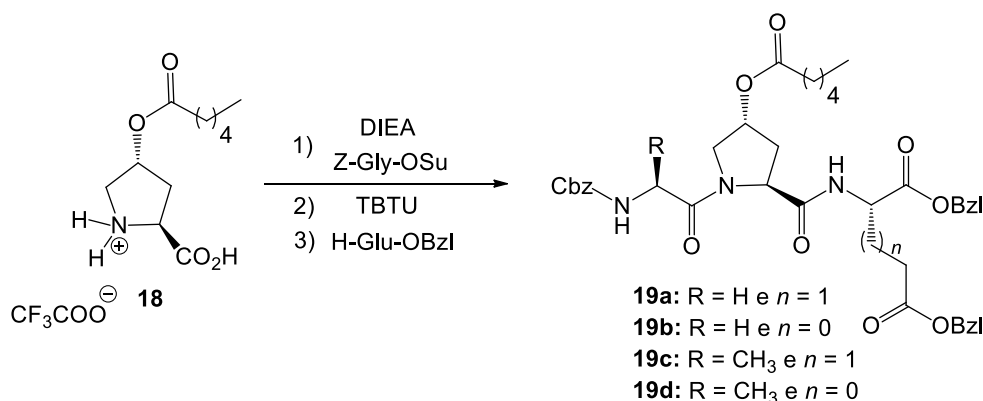
O mecanismo proposto para esta reação está representado no Esquema 51. Inicialmente, após dissolver o aminoácido **18** em DCM, adicionou-se DIEA de forma a desprotonar a amina da 4-hidroxiprolina. De seguida adicionou-se o segundo aminoácido ativado sob a forma de éster succinimida permitindo o ataque do grupo amina ao grupo carbonilo desse aminoácido formando o correspondente dipéptido. O passo seguinte foi adicionar-se o agente de acoplamento TBTU e, de seguida, o terceiro aminoácido e este passo o mecanismo é igual ao explicado anteriormente (**secção 2.2.3**).



Esquema 51 - Mecanismo da reação de acoplamento para a síntese de tripéptidos *one pot*

2.18.2 Resultados próprios

A síntese dos tripéptidos **19a-d** *one pot* pode ser representada pela reação geral apresentada em baixo (Esquema 53).



Esquema 53 - Reação de acoplamento one-pot para obter os tripéptidos 19a-d

Nesta reação de acoplamento duplo teve-se, também, em consideração o tempo de espaçamento de adição de cada reagente e a ordem de cada um para que a reação ocorresse com sucesso. Neste caso aumentou-se o tempo de espaçamento para tentar garantir que todos os intermediários se formavam.

No final da reação procedeu-se a extrações líquido-líquido com HCl 1M para remover a DIEA em excesso, transformando-a no respetivo cloreto de amónio passando facilmente para a fase aquosa. Ainda se realizou lavagens à fase orgânica com NaHCO₃ para promover a passagem do HOBt e da tetrametilureia para a fase aquosa. Por fim, foi necessário isolar-se os compostos finais por cromatografia em coluna.

Os resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos **19a-d** derivados do GPE estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos protegidos **19a-d**

Composto	R	n	Rendimento (%)
19a	H	1	60,0
19b	H	0	62,5
19c	CH ₃	1	63,8
19d	CH ₃	0	80,0

Perante os resultados obtidos pode-se verificar que a obtenção dos diferentes produtos foi satisfatória uma vez que os rendimentos das reações foram relativamente altos para uma reação de condensação. Estes resultados verifica-se que este é um bom

método para se adotar até porque reduz o número de reações para se conseguir obter um tripéptido, não há purificações intermédias e os rendimentos são bons.

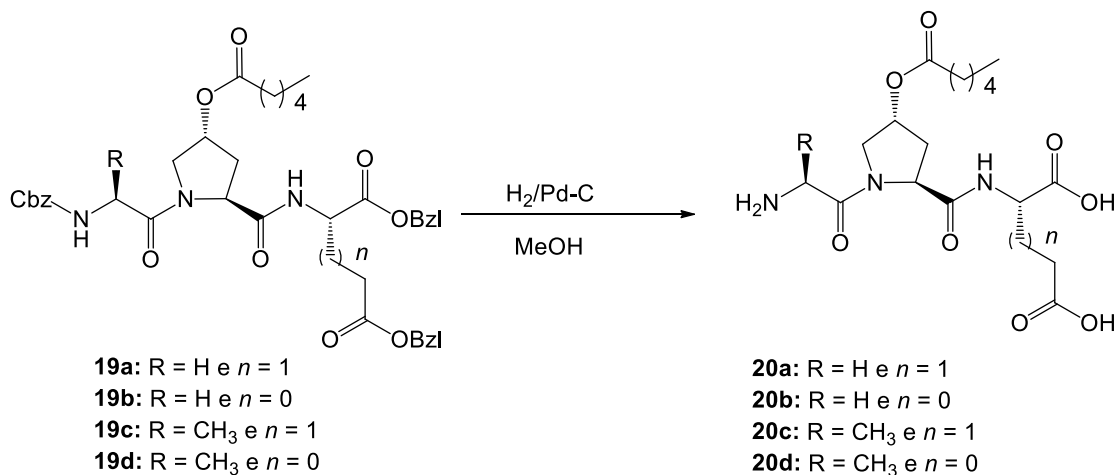
A análise estrutural dos tripéptidos **19a** (**secção 4.3.18**), **19b** (**secção 4.3.20.**), **19c** (**secção 4.3.22**) e **19d** (**secção 4.3.25**) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT, COSY, HMQC e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise dos espetros de ^1H -RMN obtidos foi facilmente identificado o grupo protetor em todos os produtos pela presença de um multipeto na zona aromática compatível com a presença do anel aromático do grupo benzilo (Ph) e ainda o seu grupo CH_2 . Pela análise de ^{13}C -RMN e DEPT também é possível identificar-se este grupo pela presença dos sinais na zona aromática. Foi possível identificar alguns sinais característicos da prolina, como é o caso dos H-4, H-2 e H-5 em ambas as análises estruturais realizadas. Verifica-se que o acoplamento duplo ocorreu com sucesso uma vez que foi possível identificar os sinais característicos de cada aminoácido adicionado. É possível, então, distinguir os tripéptidos pela identificação do grupo $-\text{CH}_3$ do resíduo L-alanina ($\text{H}_{\text{Ala-3}}$) assim como o grupo $-\text{CH}$ do resíduo L-glutamato e do L-aspartato. Por fim é possível verificar-se a presença da cadeia hidrocarbonada de 6H pela identificação de diferentes grupos $-\text{CH}_2$ e ainda o grupo $-\text{CH}_3$ final dessa cadeia. Através da análise dos espetros de ^{13}C -RMN e DEPT foi possível identificar os carbonos quaternários dos grupos CO presentes nas moléculas mas por terem desvios químicos muito próximos não se distinguiu o tipo de ligação (éster ou amida).

Realizou-se análises bidimensionais (COSY e HMQC) para caracterizar os tripéptidos protegidos de forma atribuir a correspondência entre os sinais dos protões e os respetivos carbonos. Através da análise dos espetros de HMQC foi possível atribuir os diversos sinais dos diferentes carbonos com mais precisão. Com estas análises foi possível distinguir os C-1, $\text{C}_{\text{Ala-2}}$ ou $\text{C}_{\text{Gly-2}}$, e C-4. A atribuição do $\text{C}_{\text{Ala-2}}$ e do $\text{C}_{\text{Ala-3}}$ também foram confirmados por COSY com a correlação dos respetivo protões e com os protões do grupo CH e CH_3 , respetivamente. A correlação do grupo CH dos resíduos L-glutamato e L-aspartato com os respetivos protões também foi identificada. Por fim, foi possível verificar-se a correlação entre os protões aromáticos e os protões do grupo CH_2 do grupo protetor destes tripéptidos.

2.18.3 Compostos finais: terceira família (20a-d)

O último passo para se obter os tripéptidos derivados do GPE era remover os grupos protetores e para tal recorreu-se a uma hidrogenólise. A síntese dos tripéptidos desprotegidos pode ser representada pela reação geral apresentada em baixo (Esquema 54).



Esquema 54 - Reação de hidrogenólise dos tripéptidos 19a-d para obter 20a-d

Tanto o grupo amina como o grupo ácido carboxílico tinham um grupo protetor benzilo e para os remover e, assim, obter os tripéptidos desprotegidos recorreu-se à reação de hidrogenólise tendo sido abordada anteriormente (**secção 2.3.1**).

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente (**secção 2.3.2**) para desproteger um grupo carboxílico, usando como catalisador Pd/C e sob pressão atmosférica de H₂ controlando por CCF. Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida e recristalizou-se usando éter etílico. No caso do tripéptido **20d** não foi possível recristaliza-lo e por isso recorreu-se a uma cromatografia em coluna para o isolar usando MeOH como eluente.

Os resultados obtidos para a síntese dos tripéptidos desprotegidos derivados do GPE estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Resultados para dos obtidos para a síntese dos tripéptidos finais **20a-d**

Composto	R	n	Rendimento (%)
20a	H	1	45,0
20b	H	0	46,5
20c	CH ₃	1	52,8
20d	CH ₃	0	41,5

Perante os resultados obtidos pode-se verificar que a obtenção dos diferentes produtos foi muito satisfatória uma vez que os rendimentos das reações foram relativamente altos tendo em conta que o produto é um ácido carboxílico e a sua extração era mais difícil pois tem uma polaridade elevada e fica facilmente retido.

A análise estrutural dos tripéptidos **20a** (secção 4.3.19), **20b** (secção 4.3.21), **20c** (secção 4.3.23) e **20d** (secção 4.3.25) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT, COSY, HMQC e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

Através da análise dos espectros de ^1H -RMN obtidos verificou-se que a reação de desproteção ocorreu com sucesso uma vez o multipeto na zona aromática compatível com a presença do anel aromático do grupo benzilo (Ph) e o sinal correspondente ao seu grupo CH_2 desapareceram, provando a estrutura do composto pretendido. O desaparecimento deste grupo também foi comprovado pela análise dos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT uma vez que não havia a presença de sinais na zona aromática. Foi possível identificar alguns sinais característicos da prolina, como é o caso dos H-4, H-2 e H-5. Através da análise dos espectros conseguiu-se identificar os grupos CH da prolina (C-1 e C-4) e ainda um grupo CH_2 (C-3), principalmente com a análise do espectro de DEPT. É possível, então, distinguir os tripéptidos pela identificação do grupo $-\text{CH}_3$ do resíduo L-alanina ($\text{H}_{\text{Ala}-3}$) assim como o grupo $-\text{CH}$ do resíduo L-glutamato e do L-aspartato por ambas as análises estruturais realizadas. Por fim é possível verificar-se a presença da cadeia hidrocarbonada de 6H pela identificação de diferentes grupos $-\text{CH}_2$ e ainda o grupo $-\text{CH}_3$ final dessa cadeia. É de referir que a contante de acoplamento relativa ao tripleto do grupo CH_3 final da cadeia hidrocarbonada de 6C não sofreu grandes alterações ao longo das sínteses dos diversos compostos, esta manteve-se próxima de 6,8 Hz.

Realizou-se análises bidimensionais (COSY e HMQC) para caracterizar os tripéptidos protegidos de forma atribuir a correspondência entre os sinais dos prótons e os respetivos carbonos. Através da análise dos espectros de HMQC foi possível atribuir os diversos sinais dos diferentes carbonos com mais precisão. Foi possível distinguir os C-1, $\text{C}_{\text{Ala}-2}$ ou $\text{C}_{\text{Gly}-2}$, e C-4. A atribuição do $\text{C}_{\text{Ala}-2}$ e do $\text{C}_{\text{Ala}-3}$ também foram confirmados por COSY com a correlação dos respetivo prótons e com os prótons do grupo CH e CH_3 , respetivamente. Os prótons relativos aos grupos $\text{C}_{\text{Glu}-2}$ e $\text{C}_{\text{Asp}-2}$ também foram possíveis de identificar por HMQC.

3 Conclusão

Neste trabalho foi realizada a síntese de prolinomiméticos análogos dos tripéptidos de GPE e PLG em que a L-prolina foi substituída por um sistema biciclico (2-azanorbonano). Este sistema biciclico foi obtido através de uma reação de aza-Diels-Alder com um rendimento global de 30%, estando de acordo com os dados previamente descritos. Para a obtenção destes análogos adicionou-se uma cadeia hidrocarbonada com 12C para aumentar a sua lipofilicidade e estas reações tiveram rendimentos elevados, na ordem dos 90%.

- Análogos de GPE

Relativamente á síntese dos análogos de GPE obteve-se com sucesso 4 peptidomiméticos finais (**15a-d**) contendo o sistema 2-azanorbonano como prolinomimético. Para tal foi necessário recorrer-se a duas reações de acoplamento em que se usou DIEA e o TBTU como agente de acoplamento. A primeira reação tinha como objetivo a síntese dos dipéptidos **11w,x** seguidos de uma reação de hidrólise para remover o grupo éster etílico dando origem aos dipéptidos **12w,x**. Posteriormente, foi realizada a segunda reação de acoplamento entre esses dipéptidos e os últimos aminoácidos (**13 y,z**) para se obter os tripéptidos protegidos **14a-d** com rendimentos entre 60% e 70%. Os tripéptidos **14a-d** possuíam um grupo protetor (Bzl) e para o remover e, assim, obter os tripéptidos finais (**15a-d**) pretendidos recorreu-se a uma hidrogenólise e estas reações ocorreram com sucesso com rendimentos entre os 50% e 70%.

- Análogos de PLG

No caso dos análogos de PLG também se obtiveram com sucesso 4 derivados peptidomiméticos finais (**27a-d**) contendo o sistema 2-azanorbonano como prolinomimético. Para tal, também, se recorreu a duas reações de acoplamento peptídico nas mesmas condições referidas para a síntese dos análogos de GPE. Na primeira reação de acoplamento obteve-se o dipéptido **24y** seguido de uma reação de hidrólise alcalina com o objetivo de remover o grupo éster metílico transformando-o no correspondente ácido carboxílico (dipéptido **25y**) e esta reação ocorreu com sucesso com rendimento elevado (próximo de 80%). Posteriormente realizou-se a última reação de acoplamento obtendo-se os tripéptidos **26a** e **26b** com sucesso com rendimentos próximos de 70%. Neste caso, teve-se acesso a dois dipéptidos protegidos o que permitiu a redução para uma só reação de acoplamento para obter os tripéptidos **14c** e **14d**, tendo-se previamente desprotegido desses mesmos grupos protetores (dipéptidos **29** e **31**). No caso da obtenção do dipéptido **29** recorreu-se a uma reação de desproteção do grupo protetor Boc por acidólise (rendimento de 80%), já no dipéptido **31** recorreu-se a uma hidrogenólise para a remoção do grupo Z (rendimento de 77%).

Para estes derivados era necessário obter-se uma amida primária no resíduo do aminoácido terminal e para tal recorreu-se à aminólise com amoníaco em metanol permitindo a conversão do éster metílico na correspondente amida primária com rendimentos próximos dos 60%.

- Análogos de GPE através do método de acoplamento *one pot*

Após a síntese destes derivados de PLG e GPE usando o sistema 2-azanorbornano, de forma a complementar, foi ainda possível sintetizar outro tipo de derivados. Nestes compostos a prolina foi substituída pela 4-hidroxiprolina e, nestes, também se adicionou uma cadeia hidrocarbonada (6C) através de uma reação de O-acilação com um rendimento próximo do obtido na literatura (66%). Posteriormente, recorre-se a uma reação de acoplamento duplo (*one pot*) desenvolvida pelo grupo de investigação que permitiu a adição de três aminoácidos na mesma reação usando o mesmo agente de acoplamento (TBTU) e um dos aminoácidos previamente ativado.

Este método mostrou ser bastante eficaz uma vez que os rendimentos foram relativamente altos e ainda permite a redução do número de reações para obter os tripéptidos. Ainda tem como outras vantagens o facto de não necessitar de purificações intermedias e não ser necessário reações de introdução/remoção de grupos protetores. No final desta reação para remover os grupos protetores dos aminoácidos recorreu-se a uma hidrogenólise conseguindo-se assim obter os tripéptidos finais **20a-d** com rendimentos entre 40% e 50%.

A atividade neuroprotetora dos tripéptidos finais encontra-se até ao momento sob avaliação biológica, por um grupo externo para estudar o grau de neuroprotecção destes compostos utilizando culturas neuronais expostas a condições de excitotoxicidade mediada por glutamato e o *stress* oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogénio. No caso dos derivados de PLG, estes irão ser sujeitos igualmente a um estudo farmacológico de forma a investigar a sua potencial ação como moduladores dos recetores D₂ através de estudos de *binding* usando radioligandos.

4 Procedimento Experimental

Aspetos gerais

Os reagentes comerciais (Sigma-Aldrich, Fluorochem, Fluka e BACHEM) foram utilizados sem purificação prévia á exceção do ciclopentadieno.

Os solventes utilizados em todas as reações eram de qualidade pró-análise. Quando se pretendia o uso DCM anidro como solvente, foi efetuada uma destilação sob um agente secante adequado, neste caso, P_2O_5 em atmosfera inerte de árgon.⁷³

Para o arrefecimento da reação de Diels-Alder para $-60\text{ }^\circ\text{C}$ usou-se um banho de acetona/ N_2 líquido.

Para acompanhar a evolução das reações recorreu-se á técnica de cromatografia em camada fina (CCF), utilizando-se placas de alumínio revestidas com gel de sílica *Merk* tipo 60 F_{254} sensíveis á radiação ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. Para serem reveladas utilizou-se radiação ultravioleta no comprimento de onda referido anteriormente (lâmpada UV: VOO 7752 da *Vilben Lourmat*) e uma solução etanólica de ácido fosfomolídico, revelada a quente.

Os compostos obtidos por reações de acoplamento foram purificados utilizando a técnica de cromatografia líquida de adsorção em coluna de vidro. A fase estacionaria utilizada foi uma matriz de gel de sílica 60 Å da *Scharlau* (granulometria 0.04 – 0.06, pH = 7, superfície mássica 550 m^2 / g), que foi previamente suspensa no eluente a utilizar. A eluição e recolha das frações do eluato foram realizadas manualmente. As fases móveis utilizadas serão indicadas para cada reação realizada.

Os solventes foram eliminados sob pressão reduzida num evaporador rotativo modelo *RESONA 300*. Por vezes os produtos foram submetidos a um sistema de alto vácuo para garantir a eliminação total do solvente com utilização de N_2 .

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho *Stuart melting point apparatus SMP3* no Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela.

Os espetros de massa foram obtidos no edifício do *Centro de Apoio Científico-Tecnológico* (CACTUS) da Universidade de Santiago de Compostela. A técnica utilizada para obter os mesmos foi *electrospray* (ESI-FIA-TOF).

Os dados de Ressonância Magnética Nuclear de protão e carbono-13 (^1H -RMN e ^{13}C -RMN, respetivamente) foram obtidos na Faculdade de Química da Universidade de Santiago de Compostela fazendo parte da Rede de Infraestruturas de *Apoio á Investigación e ao Desenvolvimento Tecnológico* (RIAIDT) da Universidade de Santiago de Compostela. Os aparelhos utilizados são *Varian INova 400* e *Varian Inova 250*, operando a 400 e 250 MHz, para ^1H -RMN e 100 e 63 MHz, respetivamente, para ^{13}C -RMN. As análises espectroscópicas foram efetuadas á temperatura ambiente em

CDCl_3 , MeOD e DMSO usando o sinal do TMS e/ou do próprio solvente não deuterado como referência interna. O volume típico das amostras utilizadas foi de cerca de 500 μL e as amostras foram analisadas em tubos de quartzo (4 mm diâmetro por 140 mm comprimento).

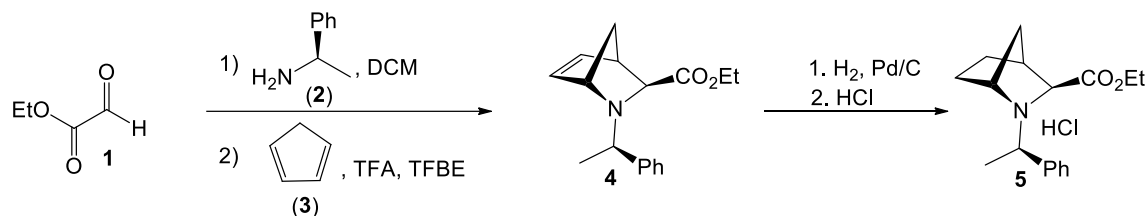
Os dados para os espectros de próton estão especificados do seguinte modo: ^1H -RMN (solvente deuterado utilizado, intensidade do campo magnético, em MHz) – δ H (desvio-químico em ppm), multiplicidade do sinal (s: singlete, d: duplete, t: tripleto, m: multiplete), área relativa do sinal (nH como número de prótons), constante de acoplamento (J, em Hertz), localização dos prótons na molécula.

Os dados para os espectros de carbono-13 estão especificados do seguinte modo: ^{13}C -RMN (solvente deuterado utilizado, intensidade do campo magnético, em MHz) – δ C (desvio químico em ppm), localização do átomo de carbono na molécula e indicando os carbonos quaternários como **C**.

A nomenclatura para a localização dos prótons e/ou átomos de carbono nas cadeias peptídicas para efeitos de RMN foi efetuada de acordo a identificação do resíduo de α -aminoácido através do sistema de uma letra (**Gly**: glicina; **Leu**: L-leucina; **Val**: L-valina; **Ala**: L-alanina; **Glu**: L-glutamato; **Asp**: L-aspartato) em subscrito, com indicação do próton (ou grupo de prótons) e do carbono respetivo iniciando a numeração da cadeia principal para cada resíduo de α -aminoácido no carbono do seu grupo carbonilo.

4.1 Síntese de 2-azabicclo[2.2.1]heptano

4.1.1 Síntese de (1R,3S,4S)-2-[(R)-1-feniletil]-2-azabicclo[2.2.1]-heptano-3-carboxilato de etilo



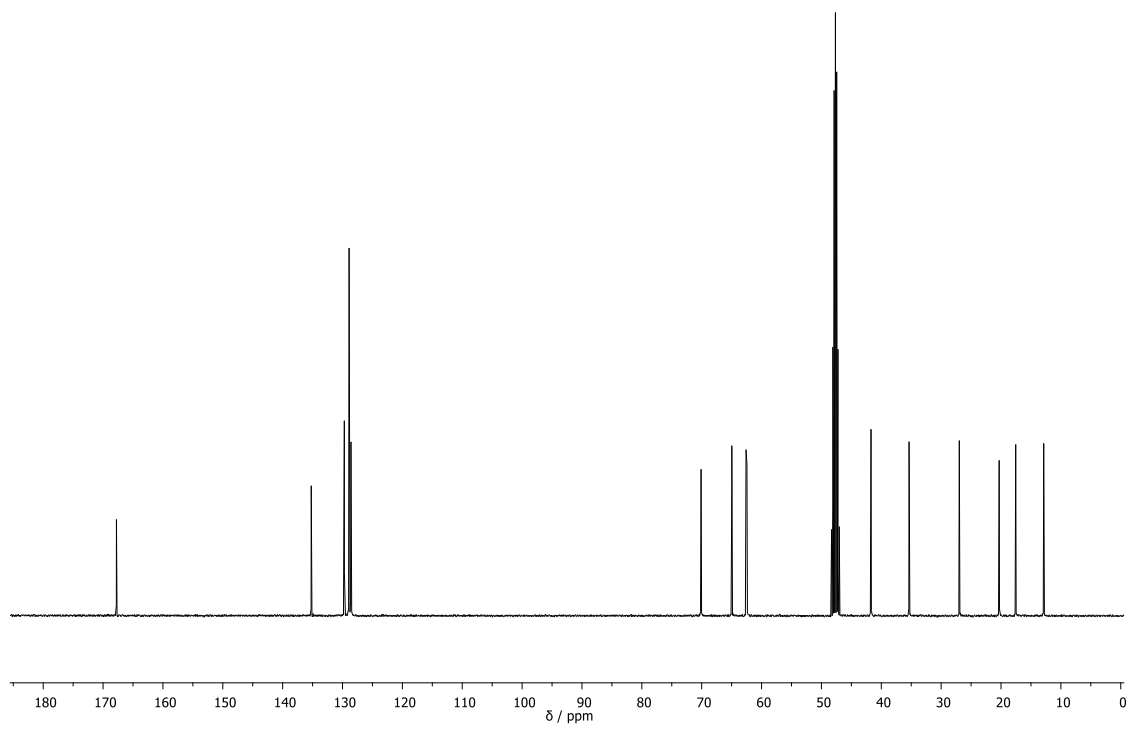
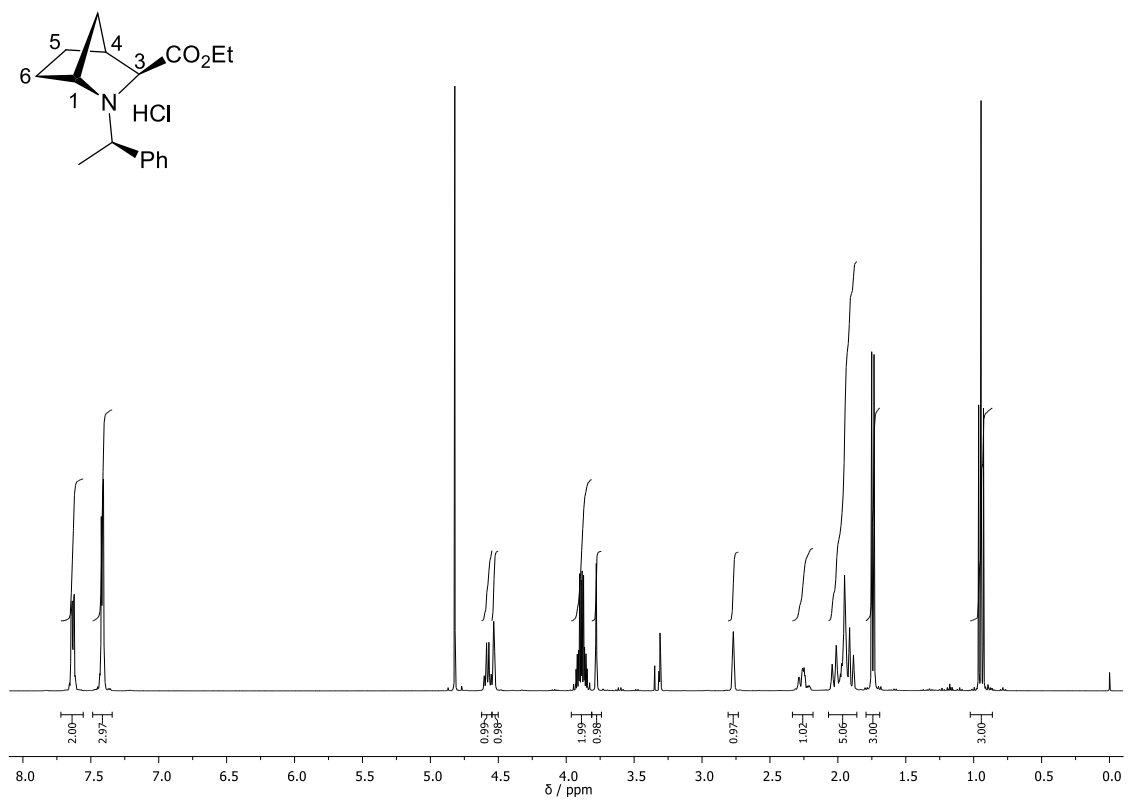
De acordo com o procedimento descrito por Tararov et al.⁷¹, num balão de fundo redondo a uma mistura a 0 °C de glicoxilato de etilo, filtros moleculares e DCM adicionou-se, lentamente, (*R*)-feniletilamina em agitação magnética durante 1h. Posteriormente a mistura reacional foi arrefecida até -60 °C e adicionou-se ciclopentadieno e de seguida CF₃COOH e BF₃.Et₂O. A mistura reacional foi mantida a essa temperatura durante 2h e, posteriormente, foi mantida à temperatura ambiente e realizou-se extrações líquido-líquido onde a fase aquosa e orgânica foram lavadas com DCM e NaHCO₃, respetivamente. A fase orgânica foi lavada com água, de seguida seca com MgSO₄ e por fim filtrou-se e evaporou-se o solvente obtendo-se o aminoéster **4**.

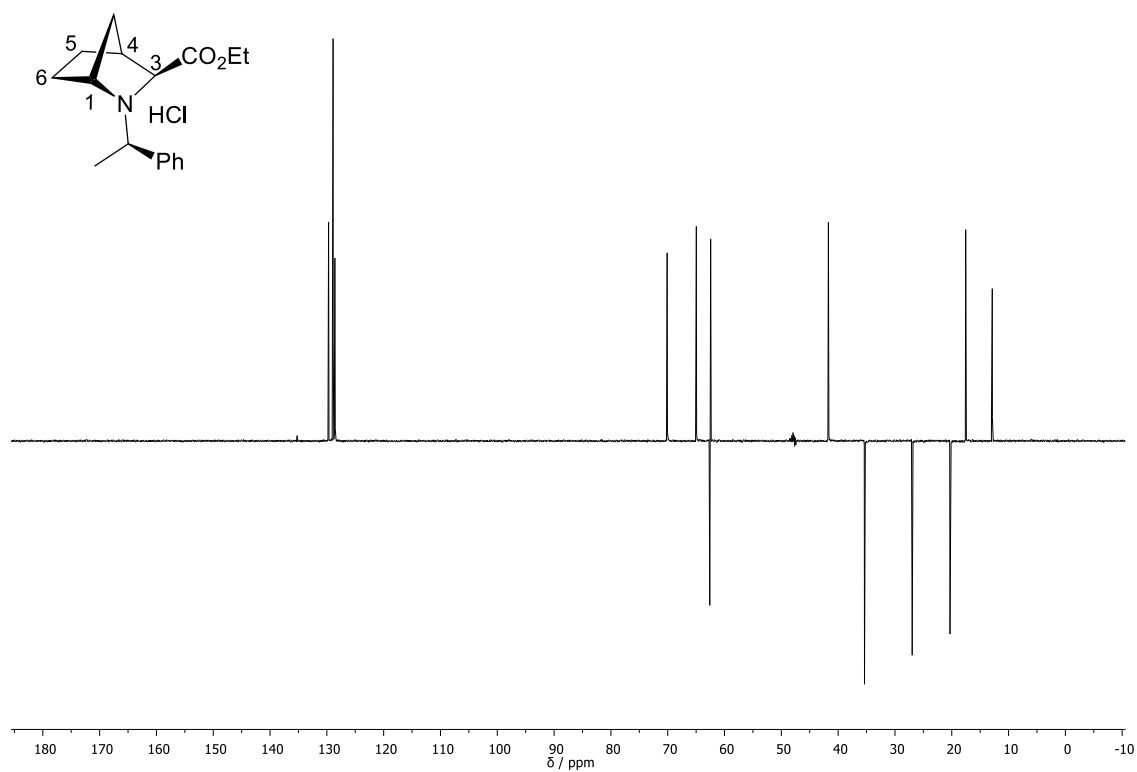
De seguida procedeu-se à hidrogenação do produto anterior utilizando Pd/C como catalisador em EtOH a uma pressão inicial de 50 bar de H₂ durante 4h. Posteriormente a mistura reacional foi filtrada sobre celite e lavada com EtOH. À mistura filtrada foi adicionado HCl e depois evaporou-se o solvente. Este procedimento foi repetido até se formar um resíduo semi-cristalino. De seguida, foi tratado com uma mistura de Et₂O/PrOH (5:1) até precipitar cristais. O sólido formado foi lavado, sucessivamente, com uma mistura de Et₂O/iPrOH (5:1) e com Et₂O e, posteriormente, evaporou-se o solvente obtendo-se o aminoéster **5**. O rendimento total desta reação foi próximo de 30%.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,72–7,56 (m, 2H, Ph); 7,49–7,34 (m, 3H, Ph); 4,58 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H, NCHCH₃); 4,53 (s, 1H, H-3); 3,95–3,83 (m, 2H, CH₂CH₃); 3,78 (s, 1H, H-1); 2,77 (s, 1H, H-4); 2,33–2,18 (m, 1H); 2,07–1,86 (m, 5H); 1,74 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H); 0,95 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

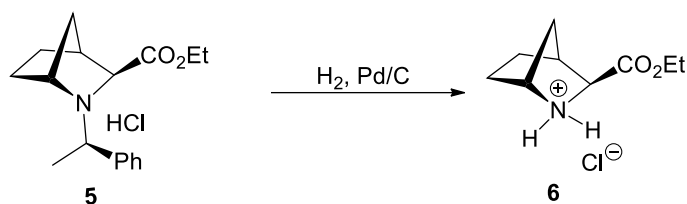
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 167,76 (C, COOEt); 129,70, (CH, Ph); 128,90 (CH, Ph); 128,59 (CH, Ph); 65,12 (CH, NCHCH₃); 70,10 (CH, H-3); 64,96 (CH, H-1); 62,53 (CH₂, CH₂CH₃); 62,54 (CH, NCHCH₃); 41,71 (CH, H-4); 17,54 (CH₃, NCHCH₃); 12,87 (CH₃, CH₂CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 310,15 obtido 310,16





4.1.2 Síntese de (1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de etilo

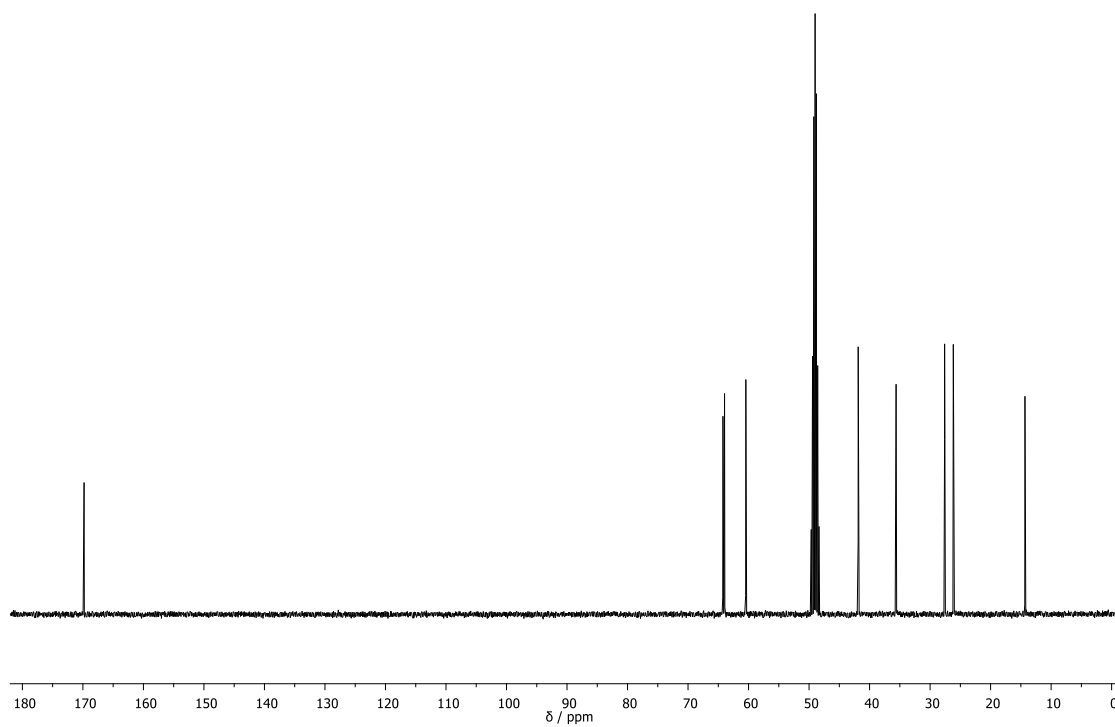
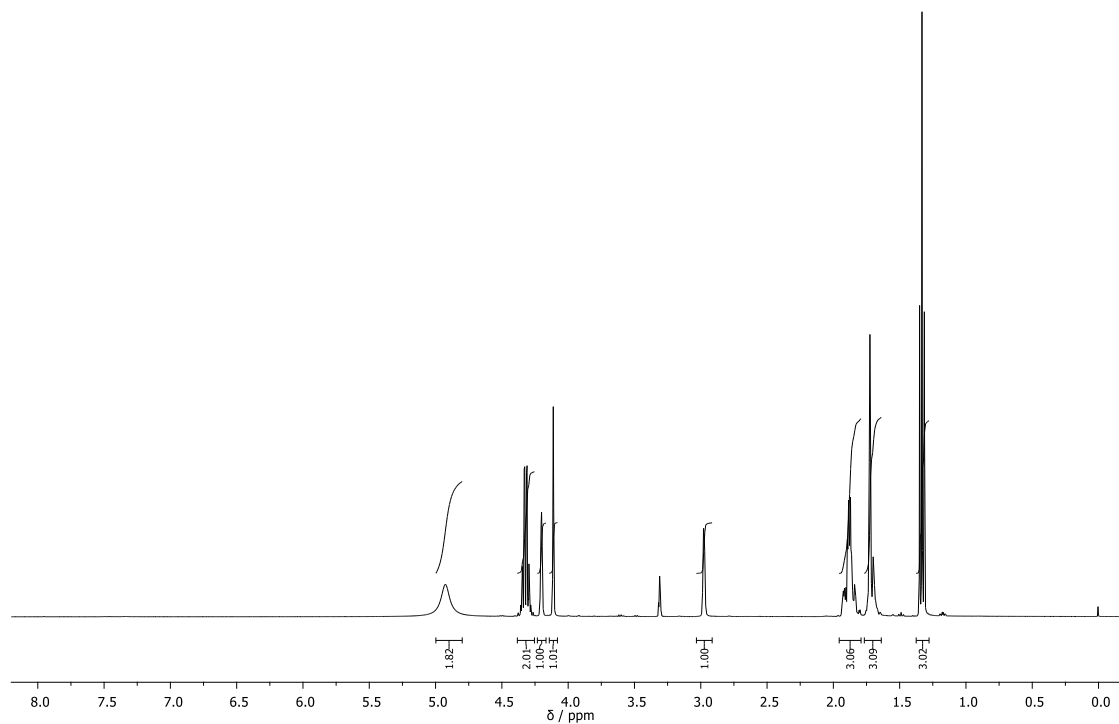
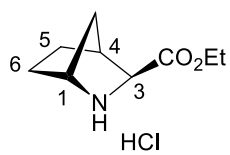


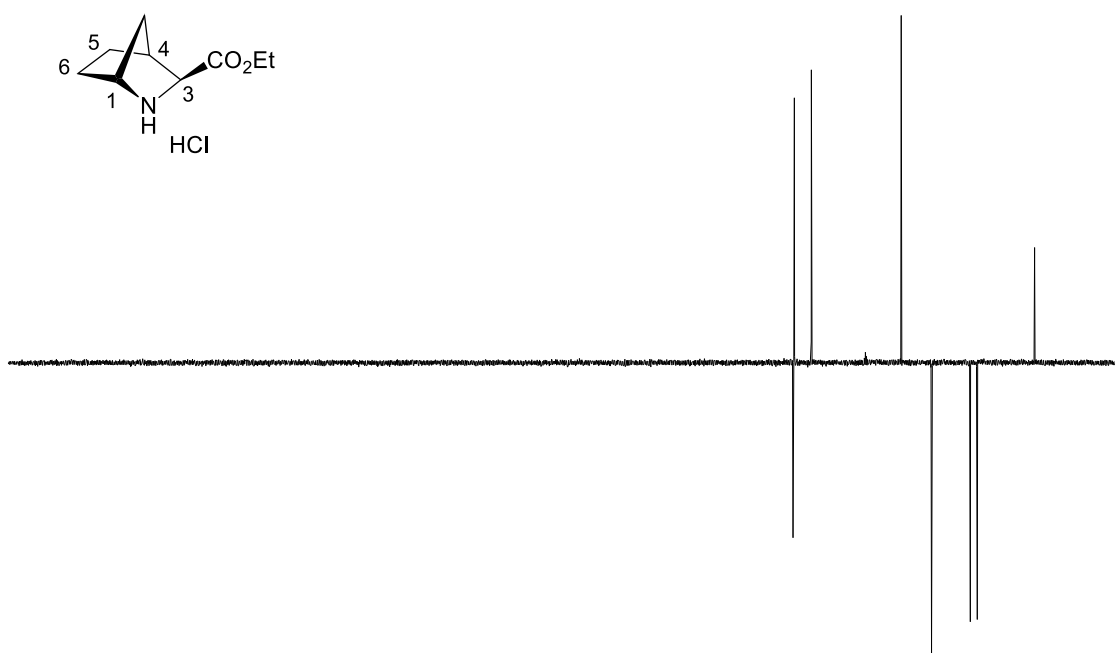
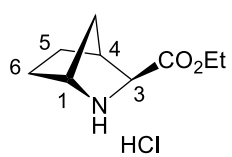
De acordo com o procedimento descrito por Tararov et al.⁷¹ o aminoéster **5** foi hidrogenado na presença de 5% Pd/C em EtOH a uma pressão de 15 bar de H₂. Após 4 dias a mistura reacional foi filtrada por celite e o composto sólido formado foi lavado com EtOH. Posteriormente, evaporou-se o solvente e o resíduo foi lavado com Et₂O/EtOH, Et₂O e seco obtendo-se o composto **6** com um rendimento próximo de 90%.

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 4,93 (s, 2H, NH₂); 4,38 – 4,25 (2H, m, CH₂CH₃); 4,20 (1H, s, H-3); 4,11 (1H, s, H-1); 2,98 (1H, s, H-4); 1,96–1,79 (3H, m); 1,77–1,64 (3H, m); 1,33 (3H, t, *J*=7,1, CH₂CH₃)

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) (δ ppm): 169,80 (C, CO₂Et); 64,23 (CH₂, CH₂CH₃); 63,97 (CH, H-3); 60,45 (CH, H-1); 41,88 (CH, H-4); [35,62 (CH₂); 27,60 (CH₂); 26,17 (CH₂); H-6, H-7, H-8]; 15,2 (CH₃, CH₂CH₃)

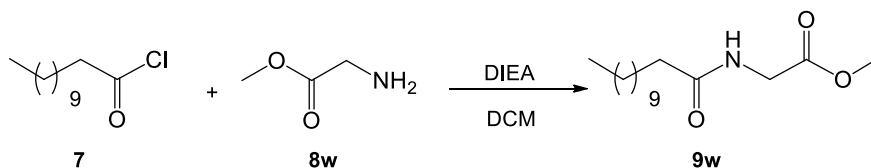
EM (ESI): *m/z* calculado para [M]⁺ 206,09 obtido 206,11





4.2 Síntese dos derivados de GPE

4.2.1 Síntese de *N*-lauroilglicinato de metilo



Para um balão dissolveu-se a glicina esterificada (**8w**) (1,7 g; 7,96 mmol) em DCM anidro. Para ajudar essa dissolução adicionou-se DIEA (2,79 mL; 15,9 mmol; 2eq) e por fim o cloreto de lauroílo (**7**) (1,84 mL; 7,97 mmol; 1.1 eq). Deixou-se a reação em agitação magnética continua num ambiente inerte durante 5h. Controlou-se a reação por TLC.

No final da reação procedeu-se a extrações liquido-liquido com DCM e solução saturada de NaHCO₃. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente obtendo-se um composto branco (**9w**) (2,15 g). Foi possível assim eliminar DIEA em excesso e obter-se o composto puro sem ser necessário realizar-se purificação por coluna cromatográfica. O rendimento da reação foi de 99,6%.

Composto: sólido branco

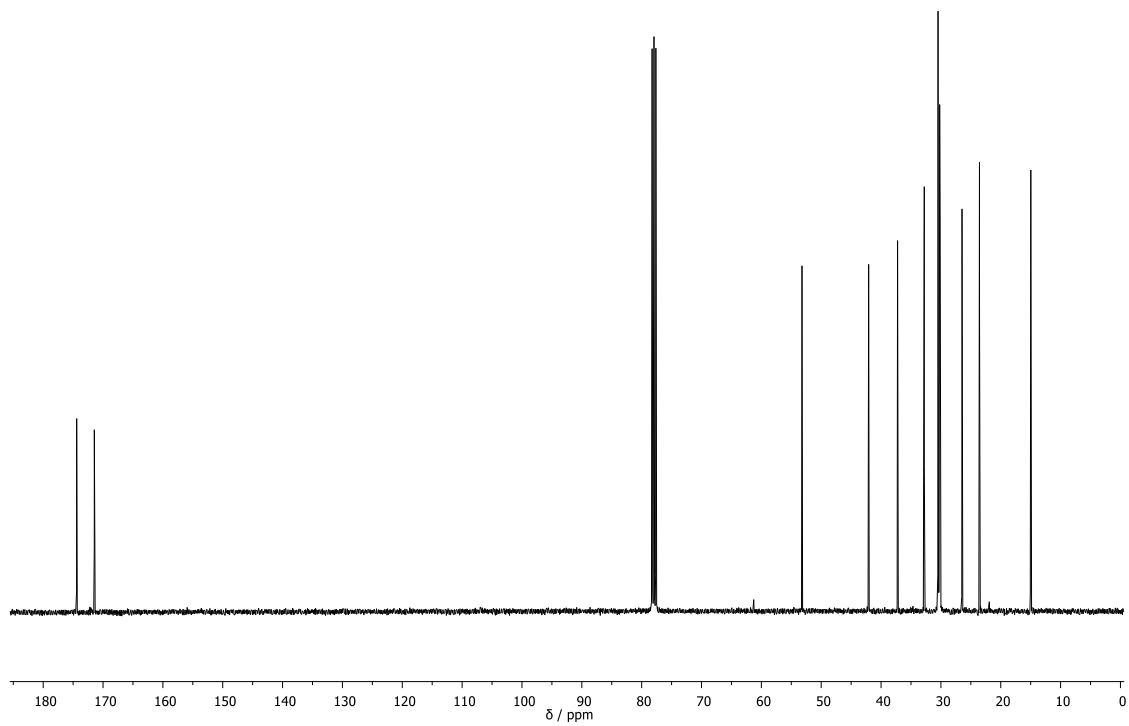
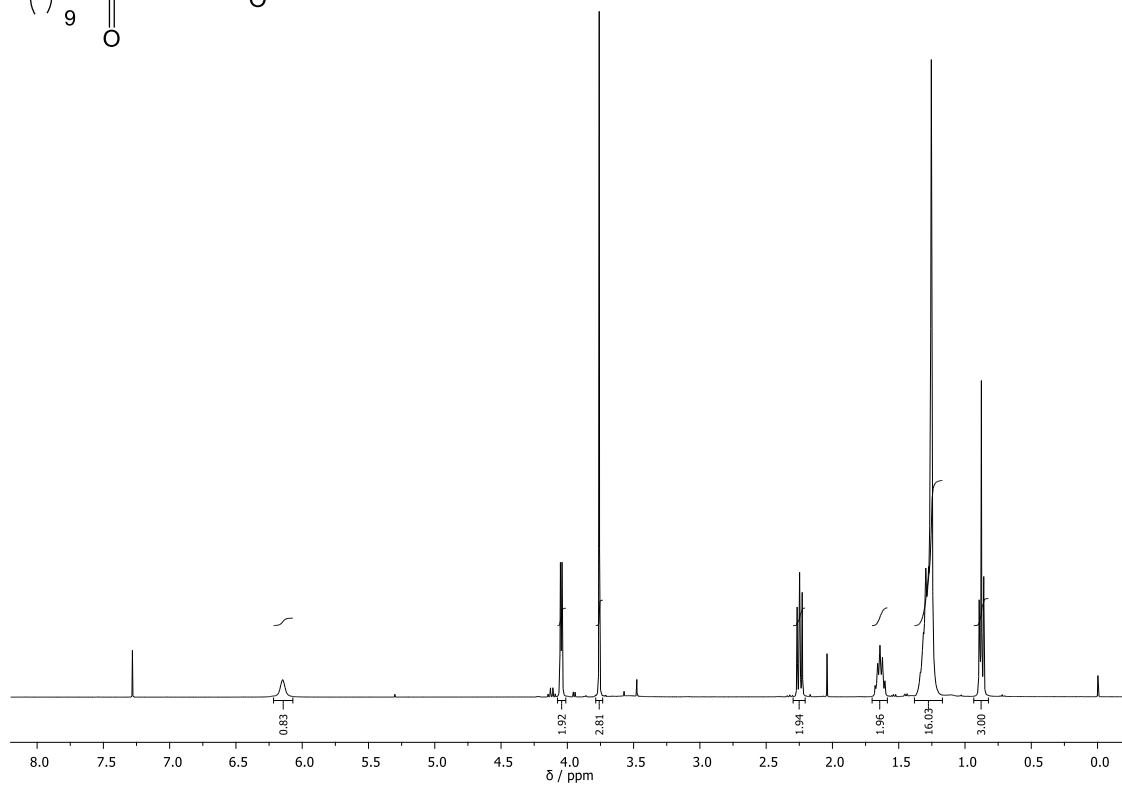
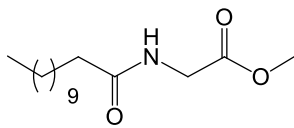
R_f: 0,64 em AcOEt

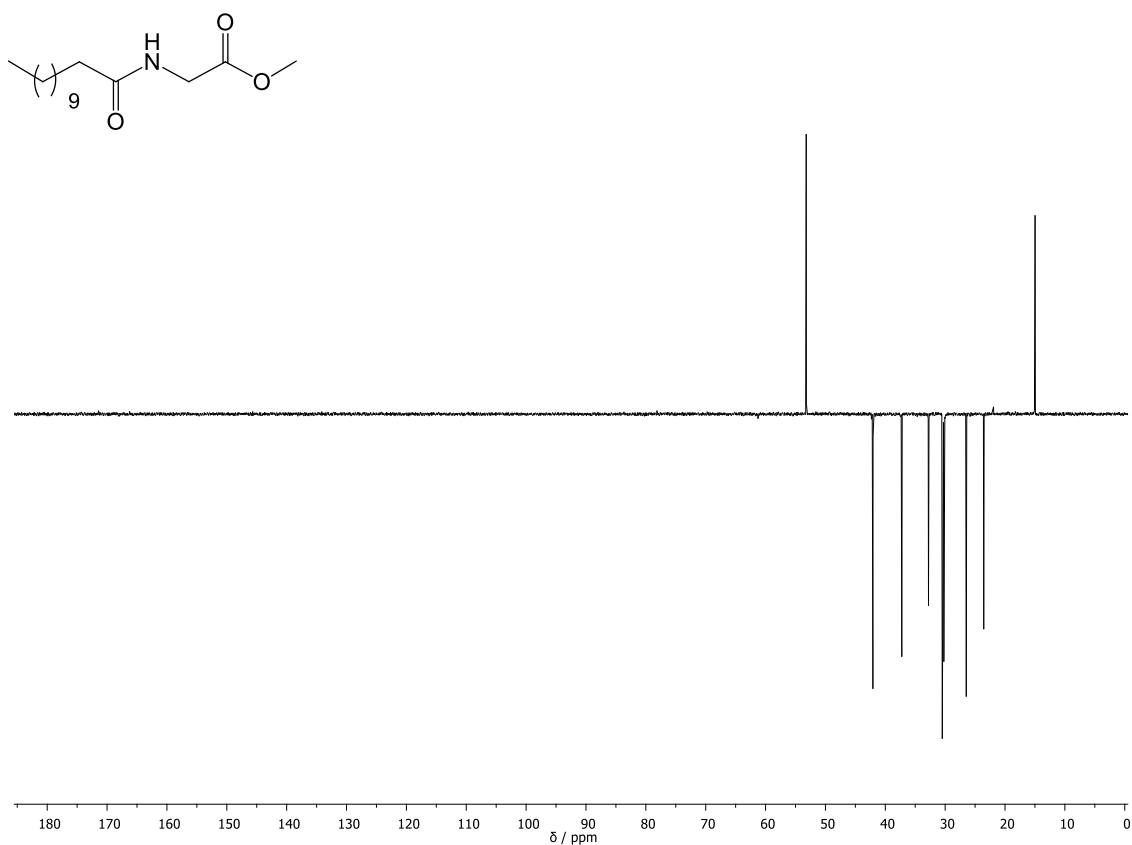
P.f.: 60 - 62 °C

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 6,15 (s, 1H, NH); 4,05 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H, H-2); 3,76 (s, 3H, OCH₃); 2,25 (m, 2H, NHCOCH₂); 1,70 – 1,59 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂); 1,38 – 1,17 (m, 16H, (CH₂)₈); 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, CH₂CH₃)

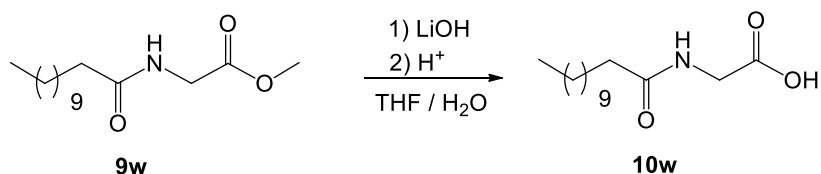
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [174,40 (C), 171,46(C), CO₂CH₃ + CONH]; 53,21 (CH₃, OCH₃); 42,07 (CH₂, C-2); 37,24 (CH₂, NHCOCH₂) 15,02 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 272,21 obtido 272,26





4.2.2 Síntese de *N*-lauroilglicina



Dissolveu-se o composto **9w** em THF (1,6 g; 6,00 mmol) num balão de fundo redondo e adicionou-se LiOH (0,560 g; 24,0 mmol, 4 eq) dissolvido previamente em H₂O. Deixou-se a reação em agitação magnética constante á temperatura ambiente durante 4h e esta foi controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se a mistura reacional, protonou-se o composto adicionando H₂SO₄ até a pH 3 e filtrou-se por vácuo lavando com H₂O obtendo-se um composto branco (**10w**) (0,310 g). O rendimento da reação foi de 81,0 %.

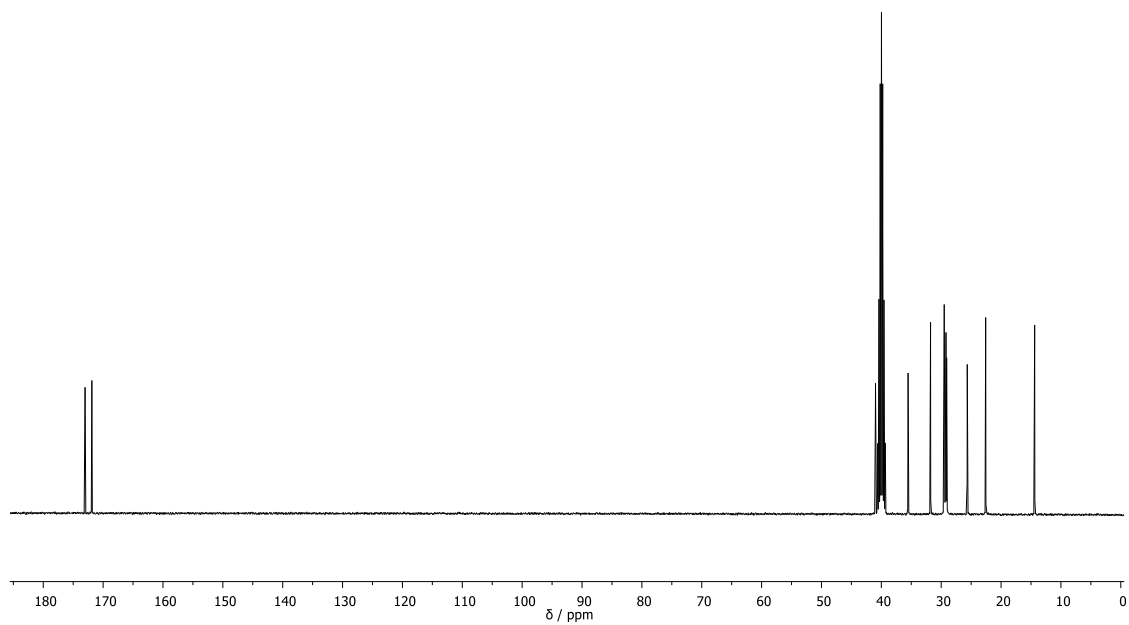
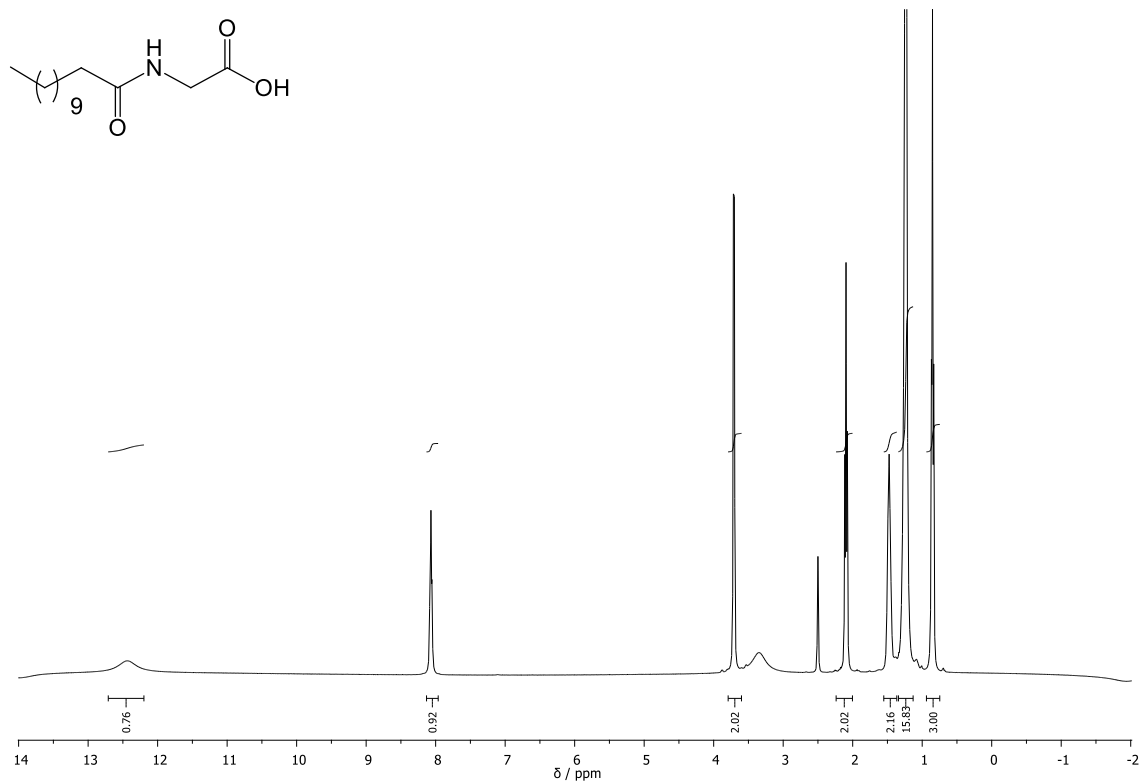
Composto: sólido branco

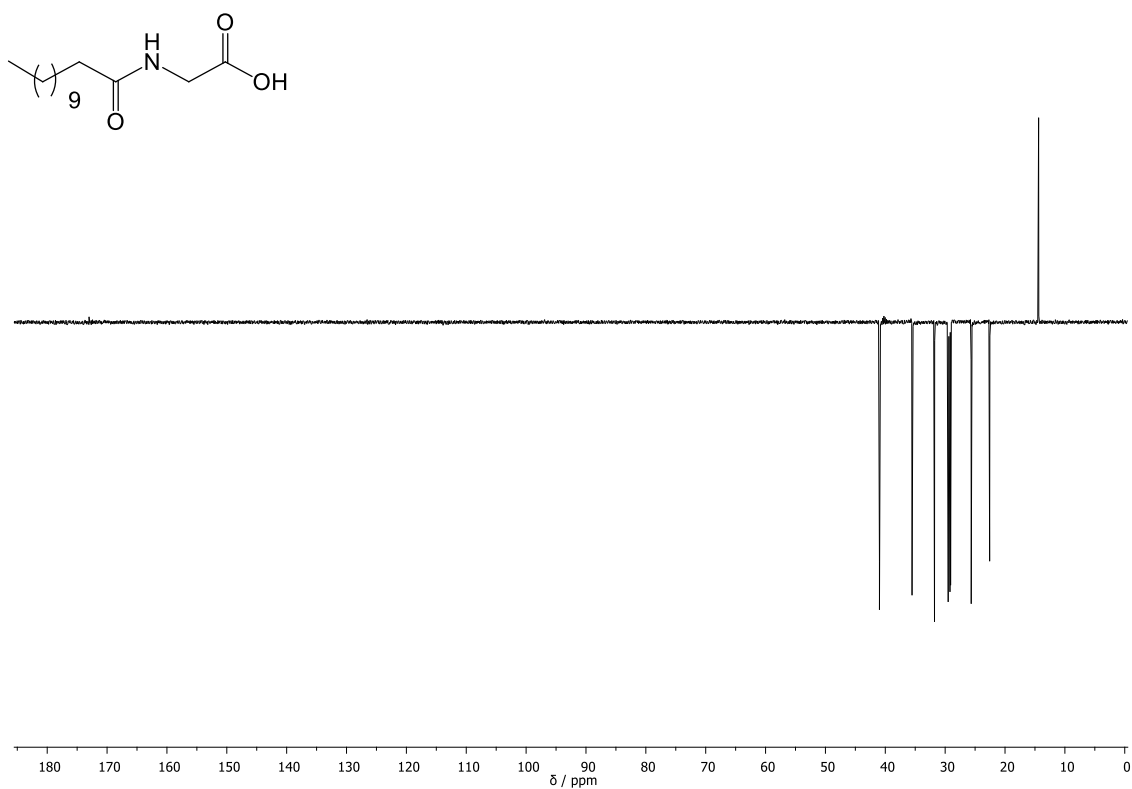
P.f.: 121 – 122 °C

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12,43 (s, 1H, OH); 8,07 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H, CONH); 3,71 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H, H_{Gly}-2); 2,10 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, NHCOCH₂(CH₂)₈); 1,43 (m, 2H); 1,24 (s, 16H, (CH₂)₈); 0,85 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, (CH₂)₈CH₃);

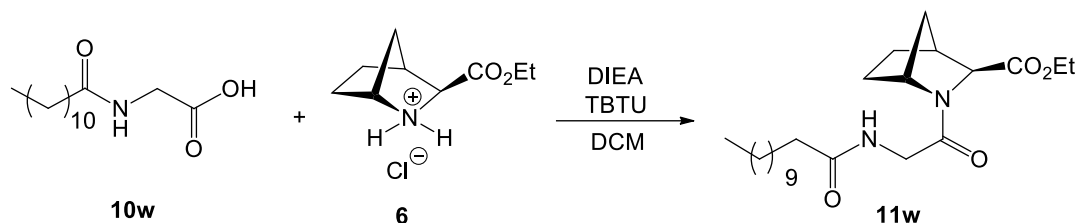
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: [173,01(C), 171,88 (C), COOH + CONH], 40,97 (C_{Gly}-2); 35,53 (NHCOCH₂(CH₂)₈); 14,39 ((CH₂)₈CH₃)

EM (ESI): *m/z* calculado para [M]⁺ 258,25 obtido 258,23;





4.2.3 Síntese de (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carboxilato de etilo



Adicionou-se o composto **10** (0,100 g; 0,389 mmol) num balão de fundo redondo e dissolveu-se em DCM anidro num ambiente inerte. Posteriormente, para ajudar a dissolução, adicionou-se DIEA (0,200 mL, 1,17 mmol, 3 eq.) e após 15 minutos de agitação magnética adicionou-se o agente de acoplamento TBTU (0,134 g, 0,417 mmol, 1.1 eq.) e por fim passado 30 minutos adicionou-se o aminoéster (**6**) (0,120 g, 0,583 mmol, 1.5 eq.). Deixou-se a mistura reacional em agitação magnética contante á temperatura ambiente e num ambiente inerte durante 5 horas sendo controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações e evaporou-se o solvente obtendo-se um óleo amarelo (**11**) (0,111 g). O rendimento da reação foi de 70,0%.

Composto: óleo amarelado

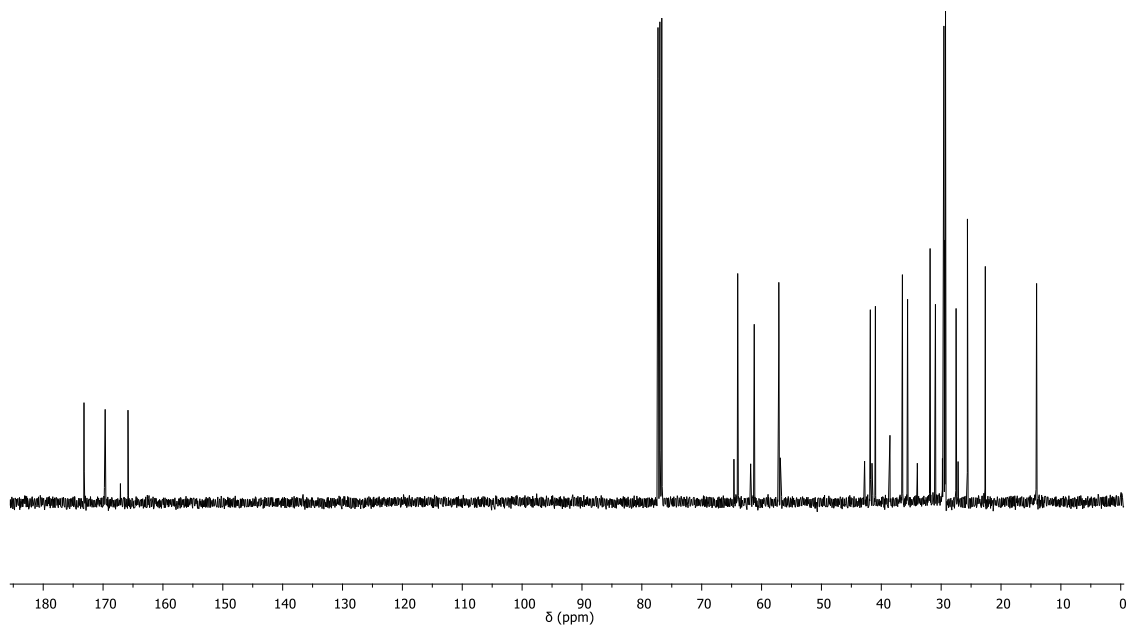
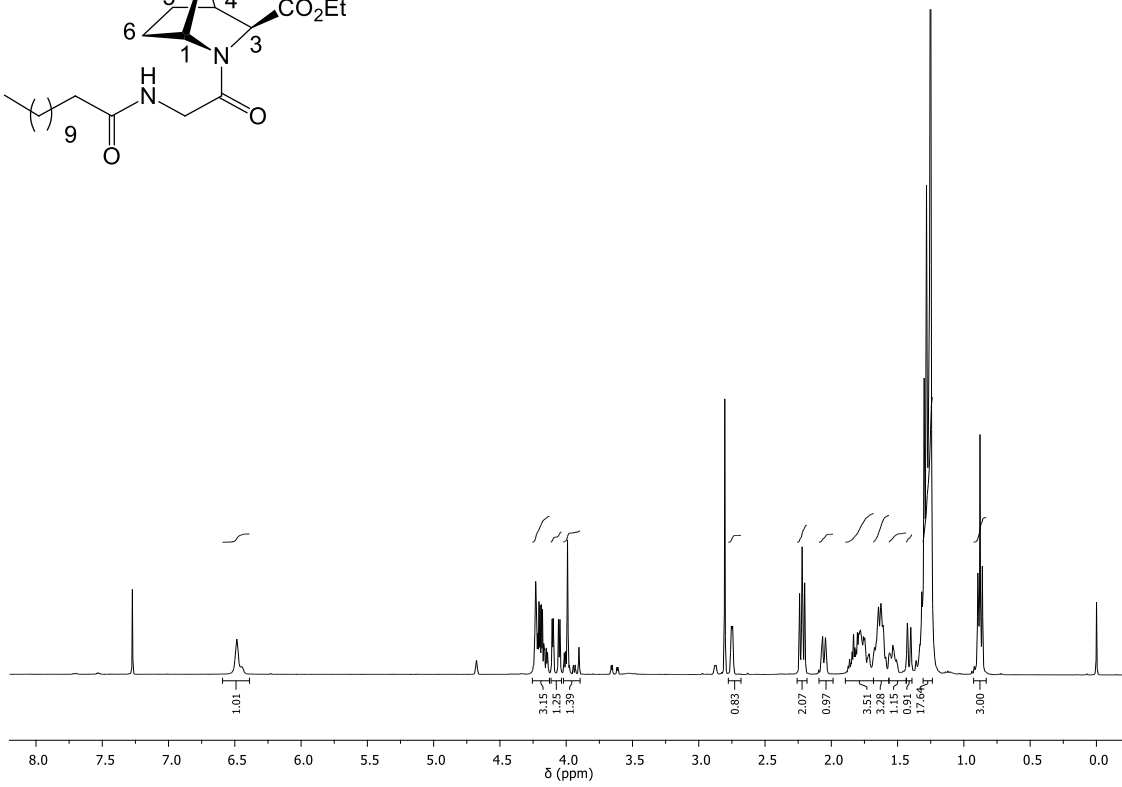
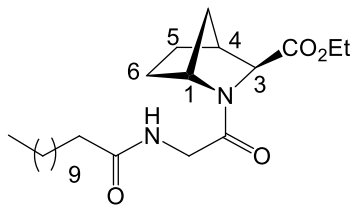
R_f: 0,67 em AcOEt

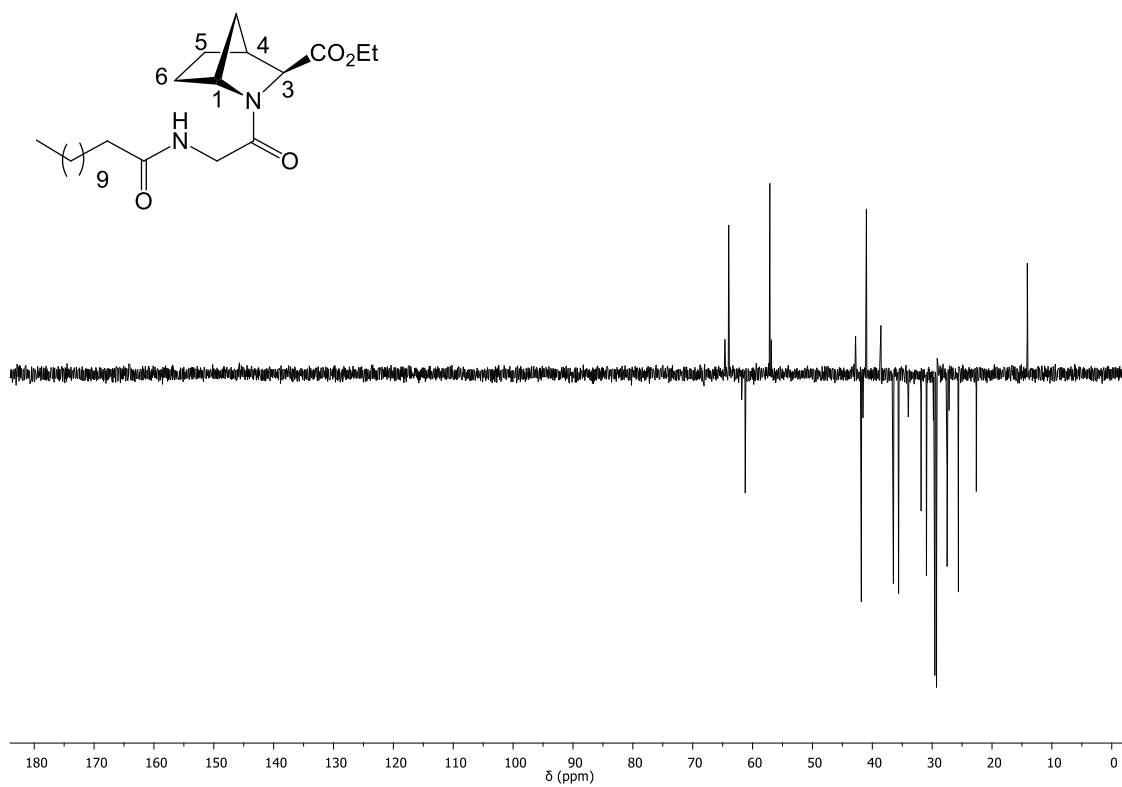
[α]_D²⁴ = − 92 (c1, MeOH)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 6,47 (d, *J* = 14,8 Hz, 1H, CONH); 4,25–4,13 (m, 3H, H-1, CO₂CH₂); 4,08 (dd, *J* = 19,5, 4,0 Hz, 1H, H-3); 4,02–3,89 (m, 2H, H_G-2); 2,76 (dd, *J* = 10,3, 3,4 Hz, 1H, H-4); 2,22 (m, 2H, COCH₂(CH₂)₈); 1,35–1,16 (m, 16, (CH₂)₈CH₃); 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, (CH₂)₈CH₃)

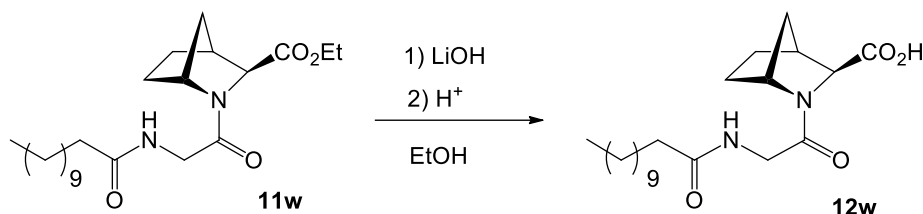
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [173,18 (C), 169,65 (C), 165,84 (C), CONH + COO + CON], 63,99 (C-3); 61,22 (CH₂, COOCH₂); 57,12 (CH, C-1); 41,83 (CH₂, C_{Gly}-2); 40,98 (CH, C-4); 14,08 (2CH₃, CO₂CH₂CH₃, (CH₂)₈CH₃);

EM (ESI): *m/z* calculado para [M]⁺ 409,30 obtido 409,32





4.2.4 Síntese do ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carboxílico



Adicionou-se o composto **11w** (0,200 g; 0,50 mmol) num balão de fundo redondo e dissolveu-se o mesmo em EtOH e, posteriormente, adicionou-se LiOH (0,070 g; 2,94 mmol; 6 eq). Deixou-se a mistura reacional em agitação magnética durante 5h á temperatura ambiente e esta foi controlada por TLC.

Após a reação terminar evaporou-se todo o solvente da mistura, dissolveu-se o composto na quantidade mínima de H₂O e adicionou-se aos poucos H₂SO₄ 1M para protonar até alcançar um pH de 3. Após o pH da mistura se encontrar ácida evaporou-se toda a água presente e dissolveu-se o composto final em DCM e adicionou-se Na₂SO₄ anidro para remover qualquer quantidade de água e, por fim, filtrou-se por vácuo obtendo-se um óleo amarelo (**12w**) (0,180 g) e o rendimento da reação foi de 94,7 %.

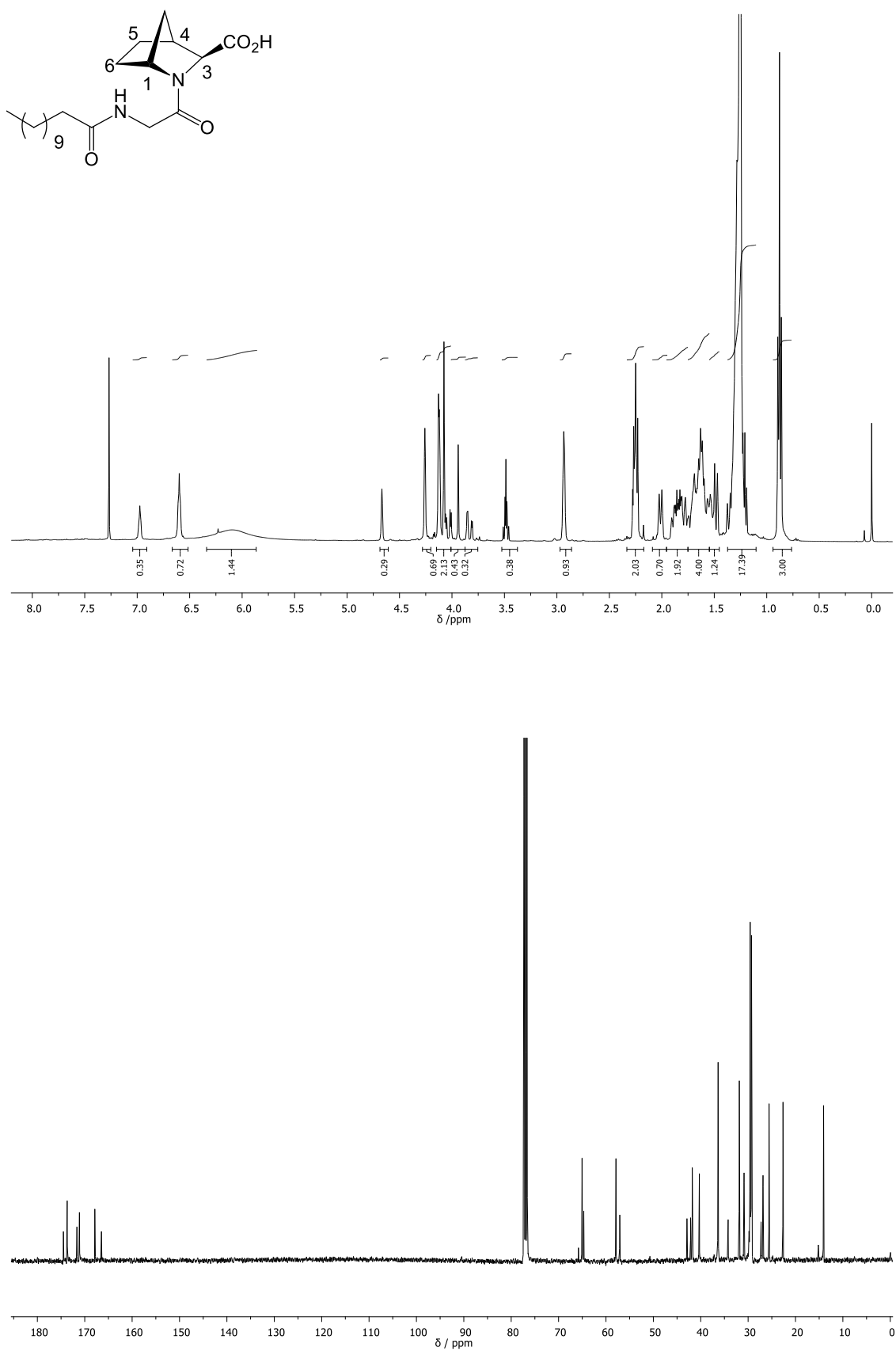
Composto: óleo amarelado

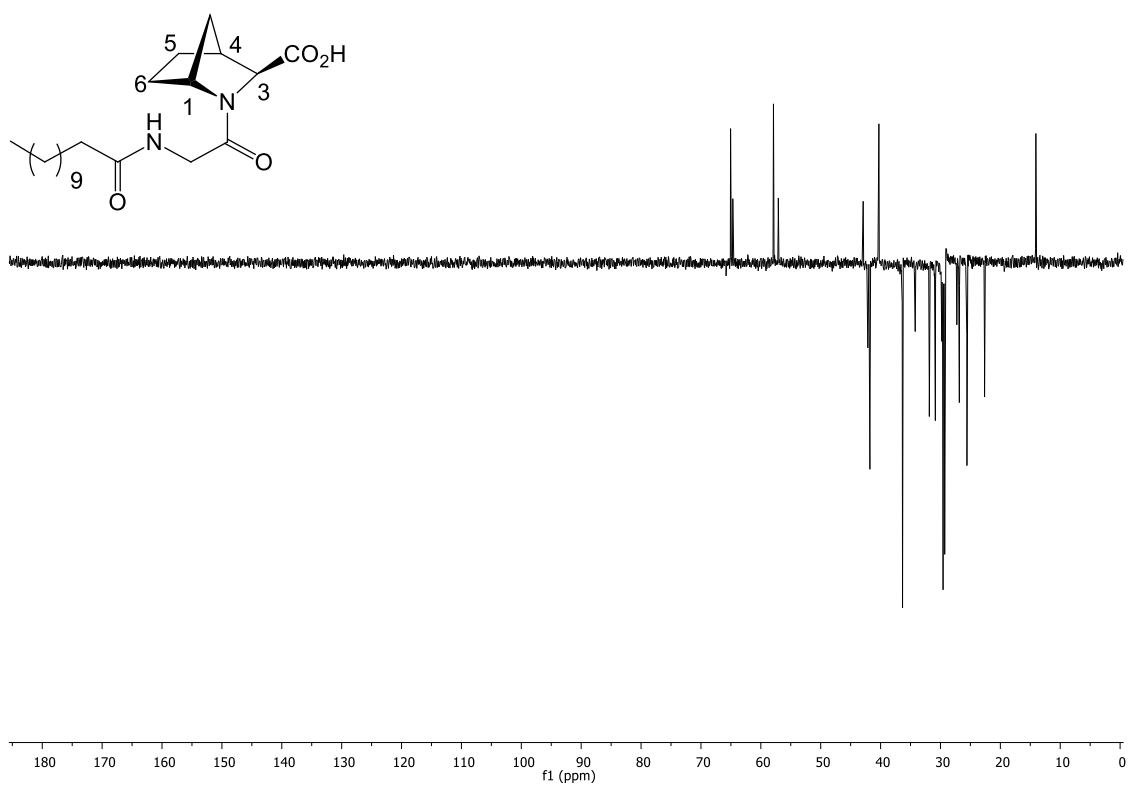
$$[\alpha]_D^{24} = -55 \text{ (c1, MeOH)}$$

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 6,74–6,51 (s, 1H, NH); 6,16 (s, 1H, OH); 4,30–4,22 (m, 1H, H-1); 4,15–3,99 (m, 2H, H_G-2); 3,88–3,78 (m, 1H, H-3); 3,49 (p, *J* = 7,0 Hz, 1H); 2,93, (s, 1H, H-4); 2,36–2,18 (m, 2H, COCH₂(CH₂)₈); 2,09–1,95 (m, 2H); 1,84 (m, 5H); 1,62 (m, 1H); 1,50–1,41 (m, 2H); 1,41–1,13 (m, 16H, (CH₂)₈CH₃); 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, (CH₂)₈CH₃);

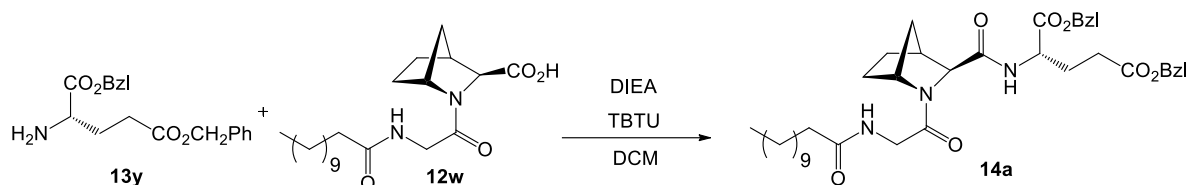
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [173,71 (C), 171,12 (C), 167,88 (C), COOH + CONH + CON], 65,05 (CH, C-3); 57,89 (C-1); 41,74 (CH₂, C_{Gly}-2); 40,28 (CH, C-4); 14,06 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M][−] 379,27, obtido 379,26





4.2.5 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-glutamato de dibenzilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o dipéptido **12w** (0,240 g; 0,630 mmol) e o hidrocloreto de L-glutamato de dibenzilo (**13y**) (0,223 g, 0,693 mmol, 1.5 eq.) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**14a**) (0,320 g). O rendimento da reação foi de 73,7 %.

Composto: óleo amarelado

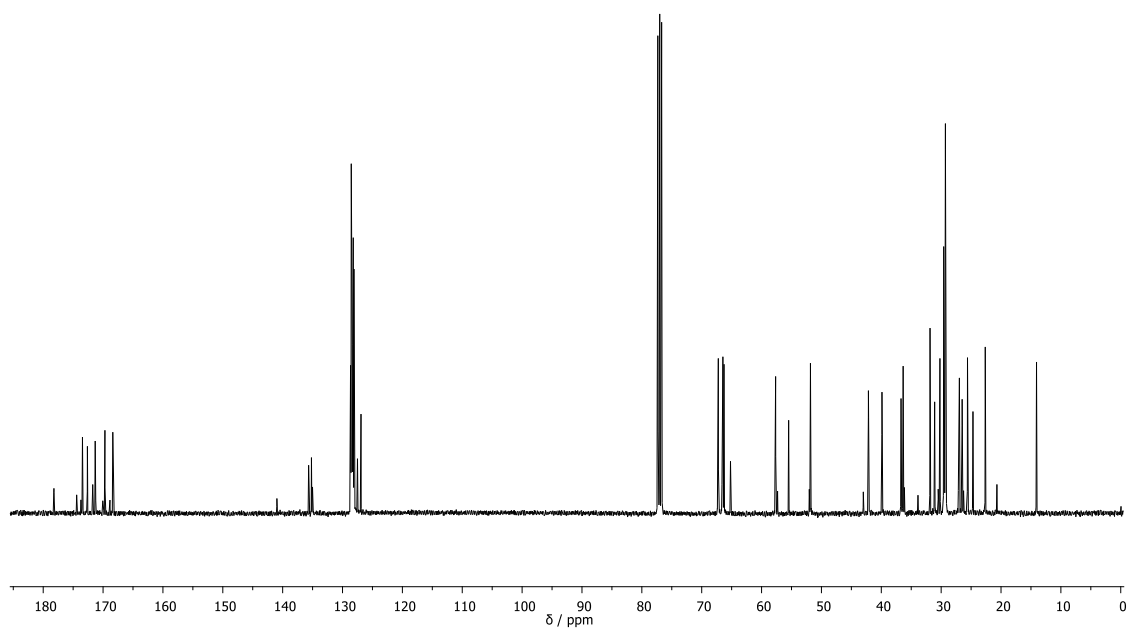
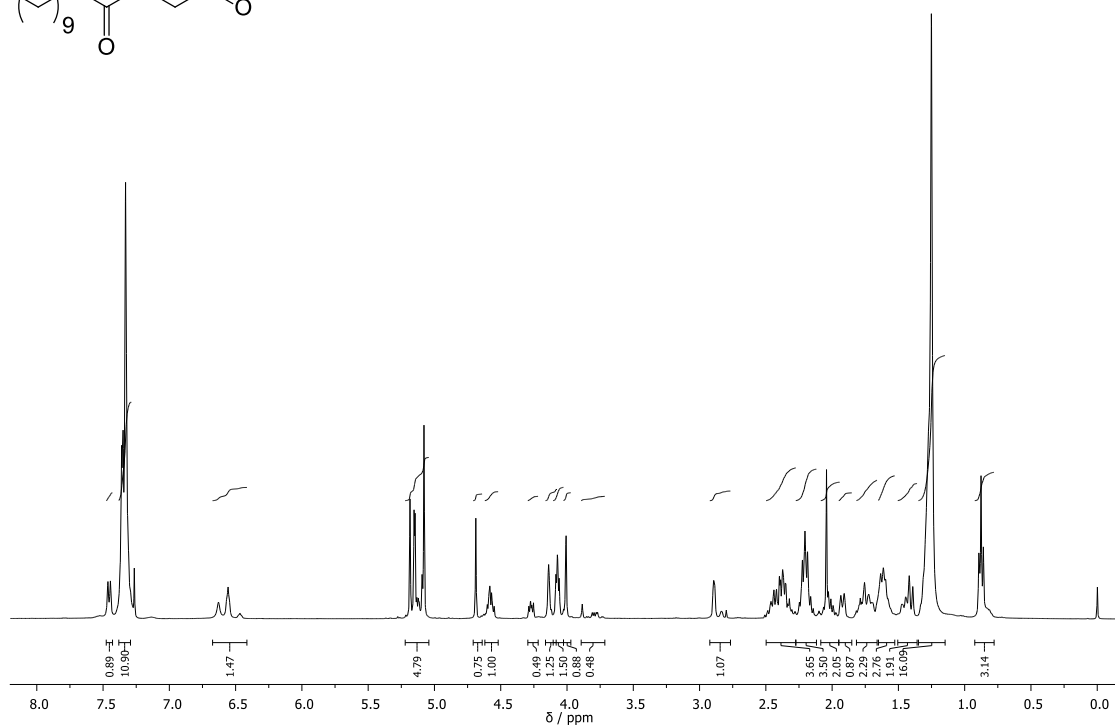
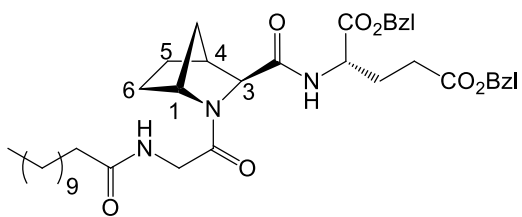
R_f: 0,57 em AcOEt

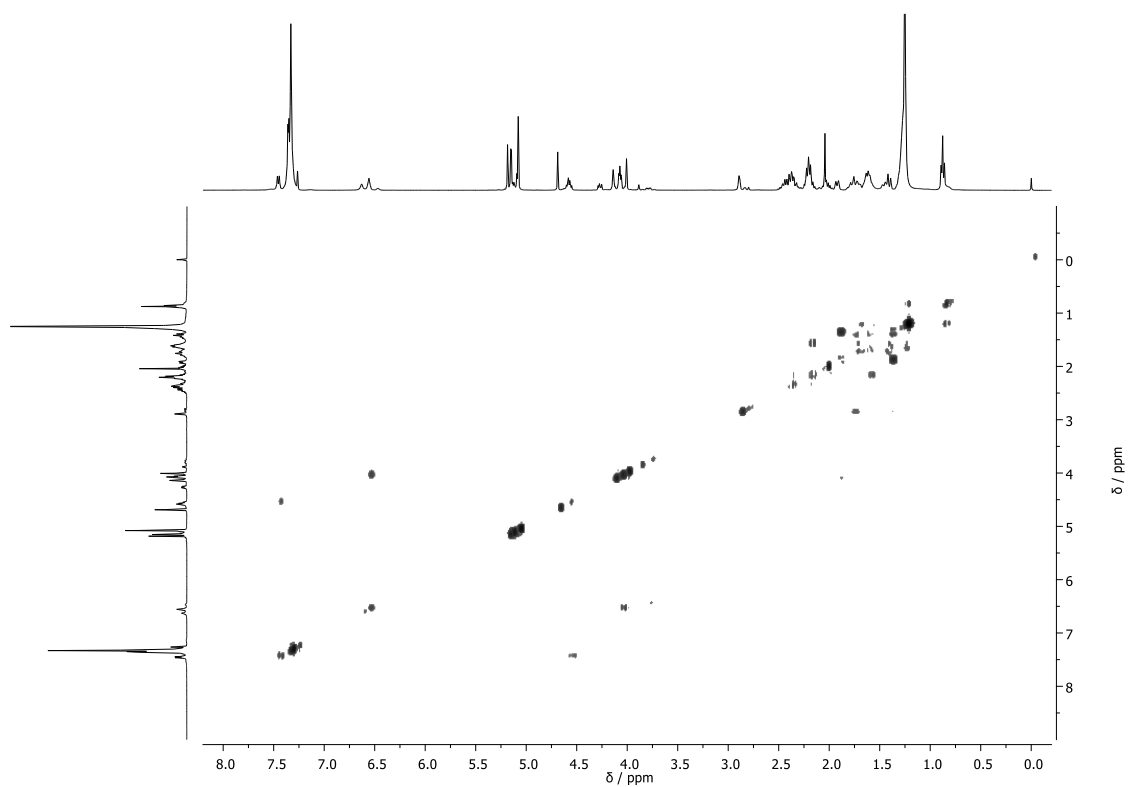
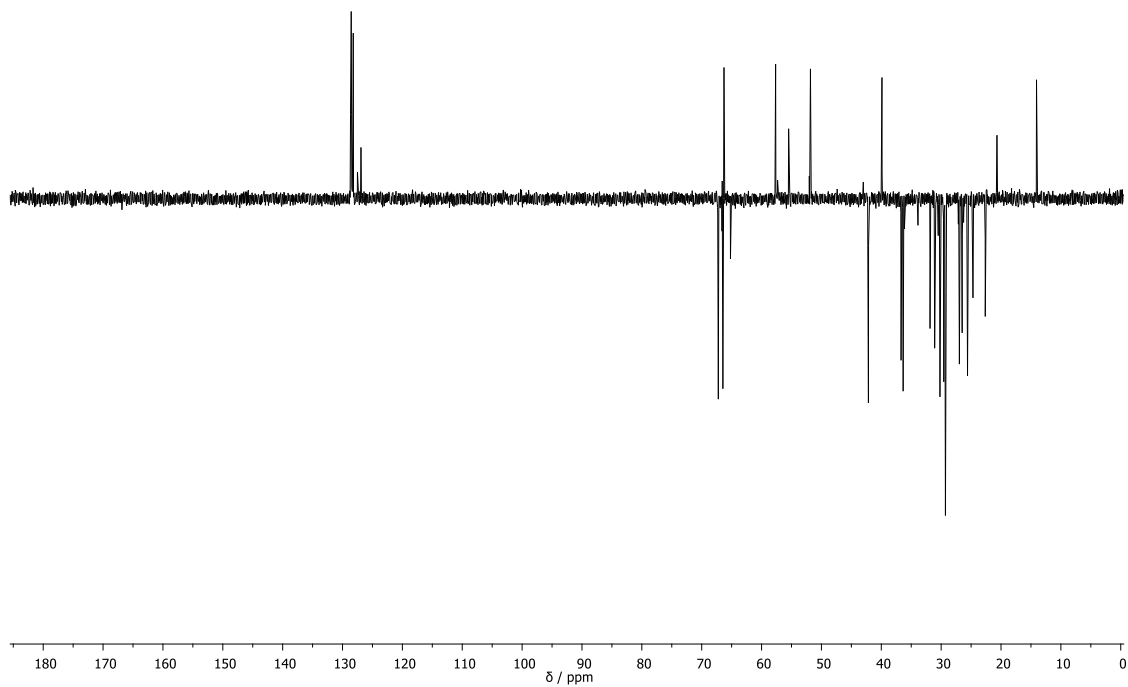
[α]_D²⁴ = – 83 (c1, MeOH)

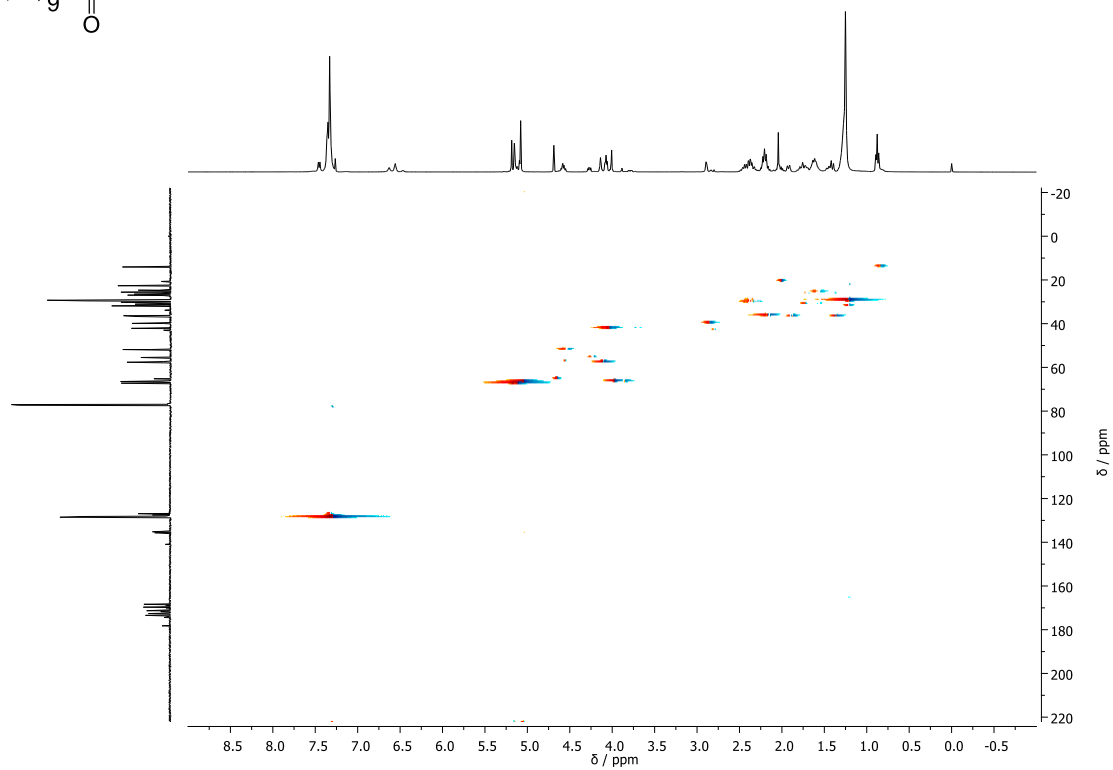
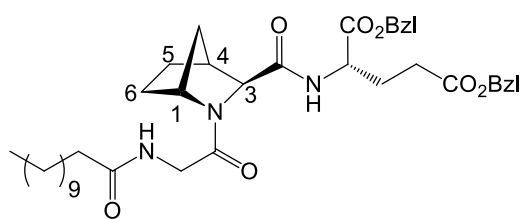
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,45 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, CONH); 7,39–7,34 (m, 10, 2xPh); 6,55 (t, *J* = 32,3 Hz, 1H, CONH); 5,25–4,98 (m, 4H, 2xCH₂OPh); 4,74–4,64 (m, 1H,); 4,64–4,49 (m, 1H, H_{Glu}-2); 4,17–4,10 (m, 1H, H-1); 4,11–4,04 (m, 2H, H_{Gly}-2); 4,02 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-3); 2,91–2,75 (m, 1H, H-4); 1,29 (s, 16H, (CH₂)₈); 0,93 – 0,76 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [173,44 (C), 172,62 (C), 171,31 (C), 169,69 (C), 168,37 (C), COOCH₂PH + CONH + CON], 135,66 (Ph); 135,10 (Ph); 128,79–128,02 (Ph); 127,50 (Ph); 126,91 (Ph); 67,26 (CH₂, CH₂Ph); 66,46 (CH₂, CH₂Ph); 66,28 (CH, C-3); 57,65 (CH, C-1); 55,48-51,83 (CH, C_{Glu}-2); 42,15 (CH₂, C_{Gly}-2); 39,89 (CH, C-4); 14,07 (CH₃, CH₃)

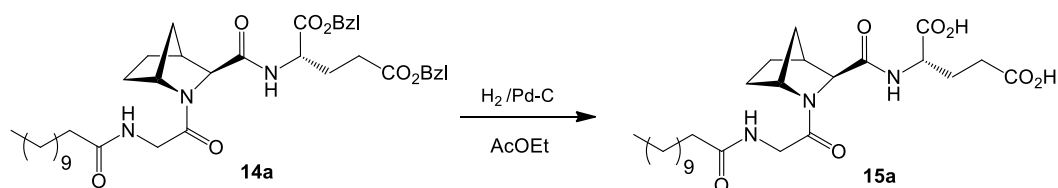
EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 690,40 obtido 690,41







4.2.6 Síntese de ácido [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-glutâmico



Dissolveu-se o tripéptido **14a** (0,250 g, 0,362 mmol) em $AcOEt$ e adicionou-se como catalisador PdC . Saturou-se o sistema com H_2 e deixou-se a mistura reacional em agitação contínua à temperatura ambiente sob pressão atmosférica de H_2 , com recurso a um balão de H_2 , durante 4 horas.

Posteriormente, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com $AcOEt$ e $MeOH$. O solvente foi eliminado por pressão reduzida originando-se um óleo amarelo (**15a**) (0,100 g). O rendimento da reação foi de 51,0%.

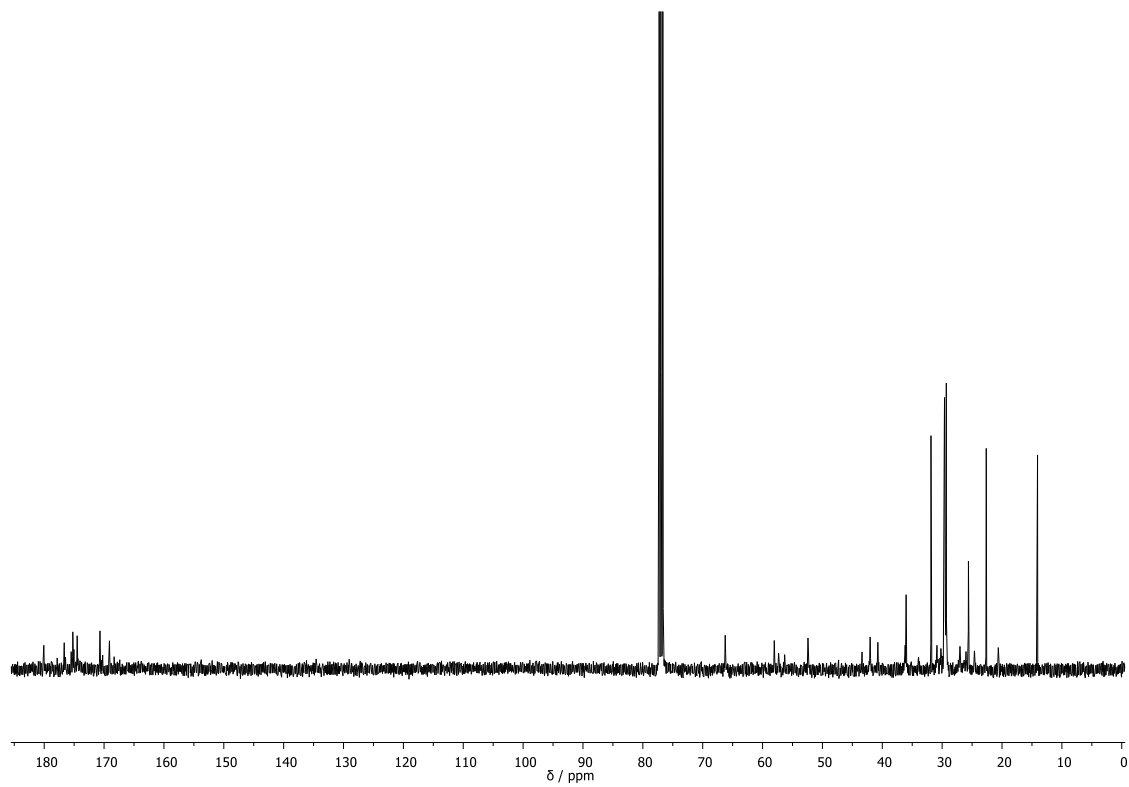
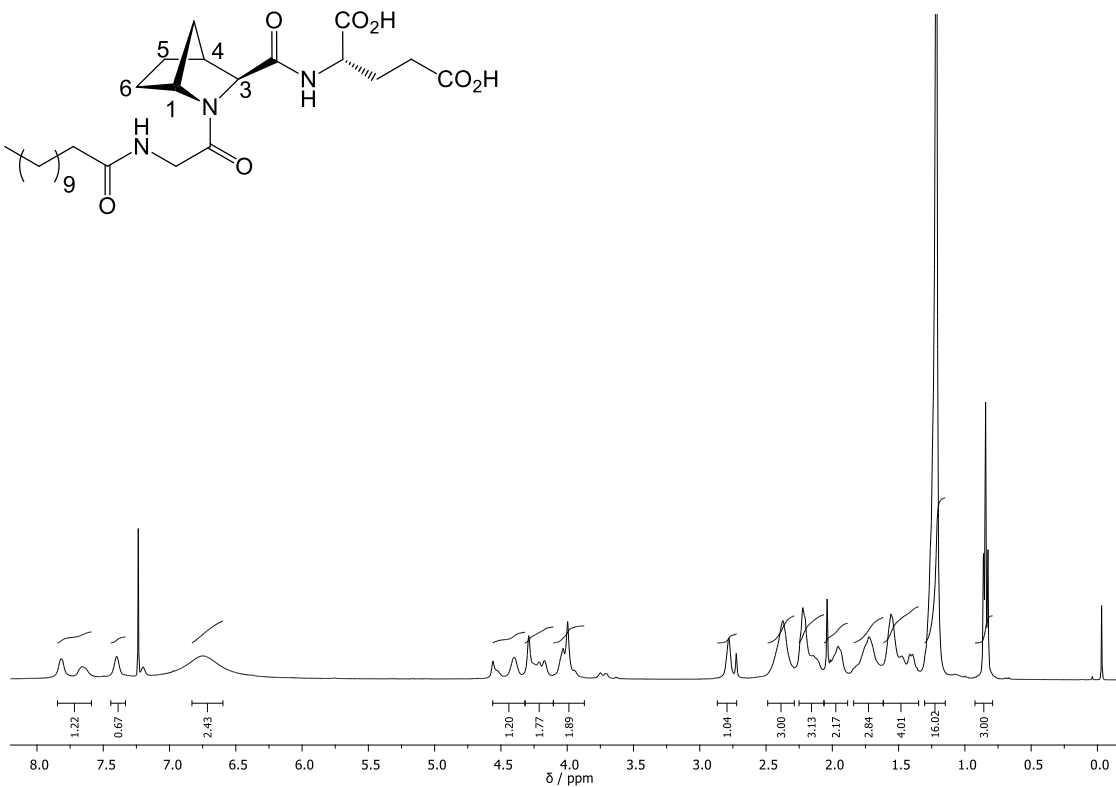
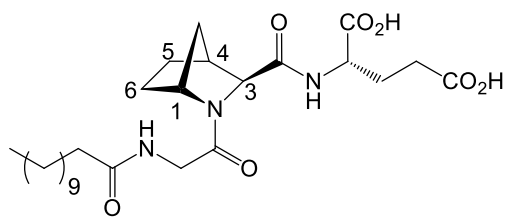
Composto: óleo amarelado

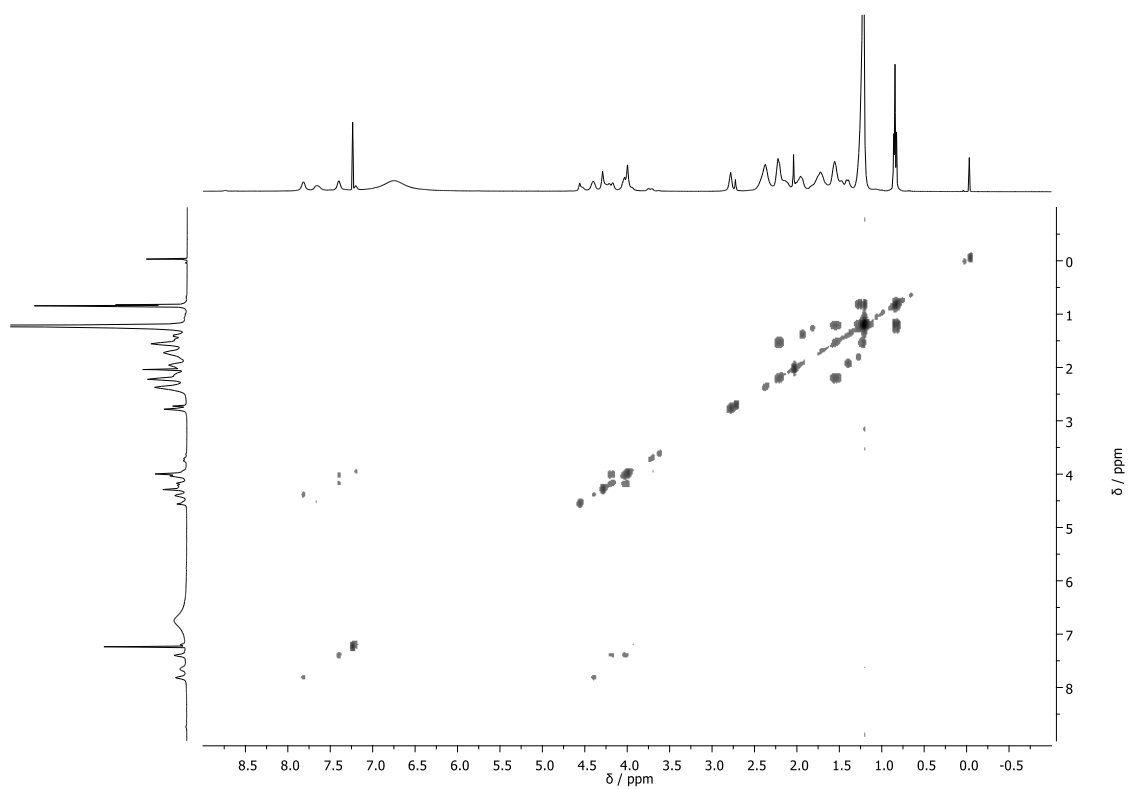
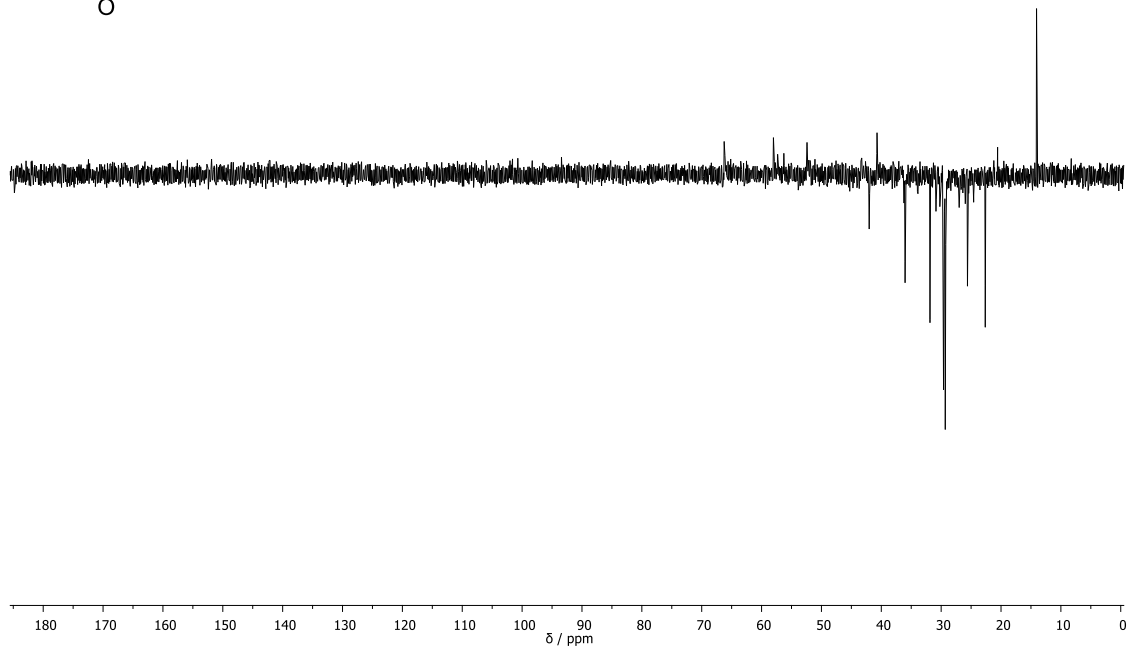
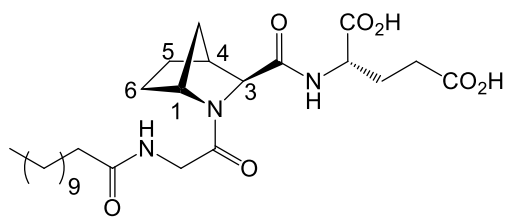
$$[\alpha]_D^{24} = -20,2 \text{ (} c1, MeOH \text{)}$$

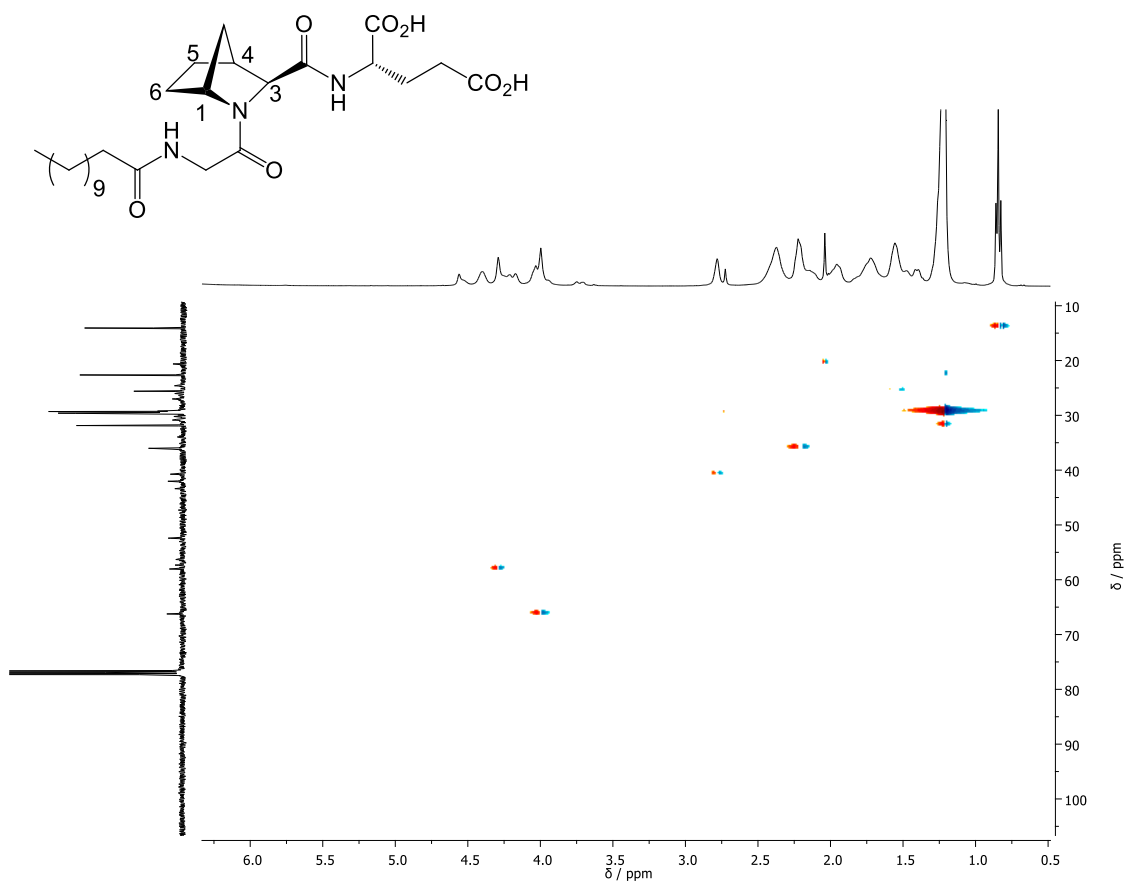
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7,74 (s, 1H, CONH); 7,37 (d, $J = 22,8$ Hz, 1H, CONH); 7,44–6,86 (s, 2H, 2xCOOH); 4,48 (d, $J = 63,9$ Hz, 1H, H_{Glu-2}); 4,32–4,11 (m, 2H, $H_{Gly-2} + H-1$); 4,11–3,86 (m, 2H, $H_{Gly-2} + H-3$); 2,75 (d, $J = 22,4$ Hz, 1H, H-4); 1,21 (s, 16H, $(CH_2)_8$); 0,84 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H, CH_3)

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : [179,96 (C), 176,66 (C), 175,22 (C), 170,69 (C), 169,10 (C), COOH + COONH + COON]; 66,24 (CH, C-3); 58,04 (CH, C-1); 52,42 (CH, C_{Glu-2}); 42,03 (CH_2 , C_{Gly-2}); 40,74 (CH, C-4); 14,07 (CH_3 , CH_3)

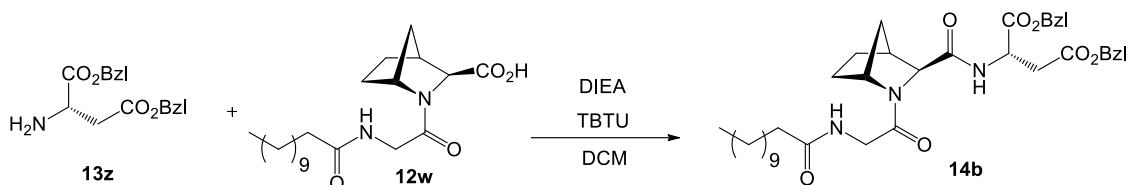
EM (ESI): m/z calculado para $[M]^-$ 508,31, obtido 508,30







4.2.7 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-aspartato de dibenzilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o dipéptido **12w** (0,100 g; 0,260 mmol) e o L-aspartato de dibenzilo (**13z**) (0,192 g, 0,394 mmol, 1.5 eq.) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo e AcOEt:Hex:MeOH (10:1:1) numa segunda coluna. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**14b**) (0,105 g). O rendimento da reação foi de 59,4 %.

Composto: óleo amarelado

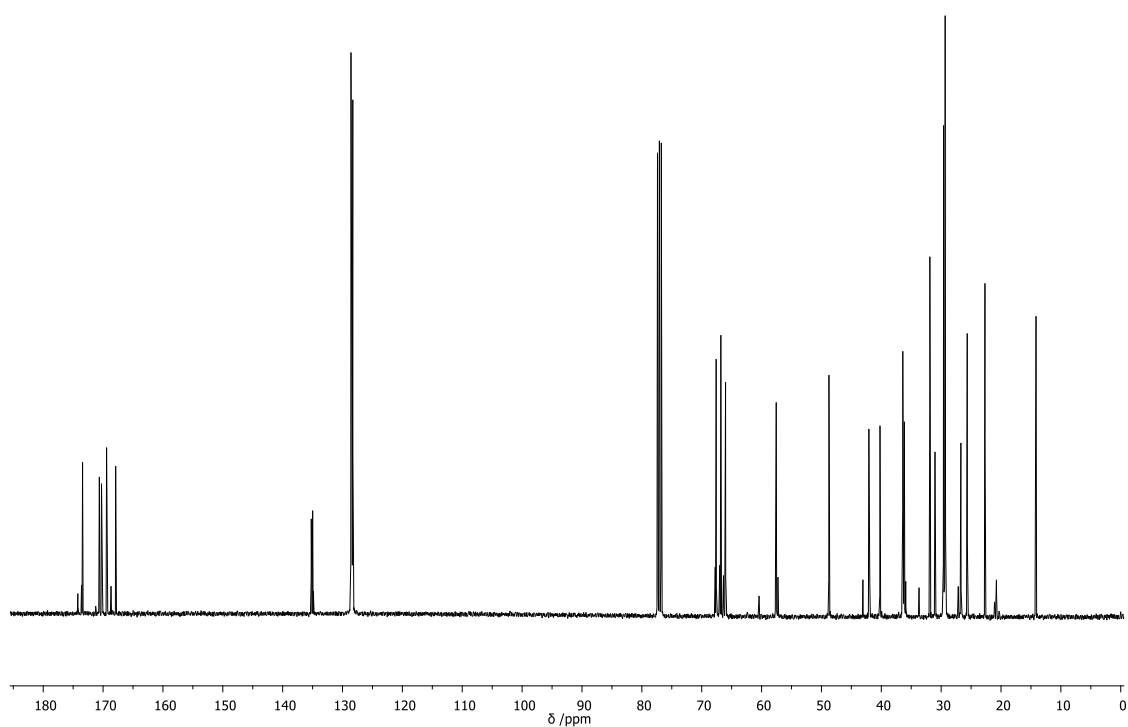
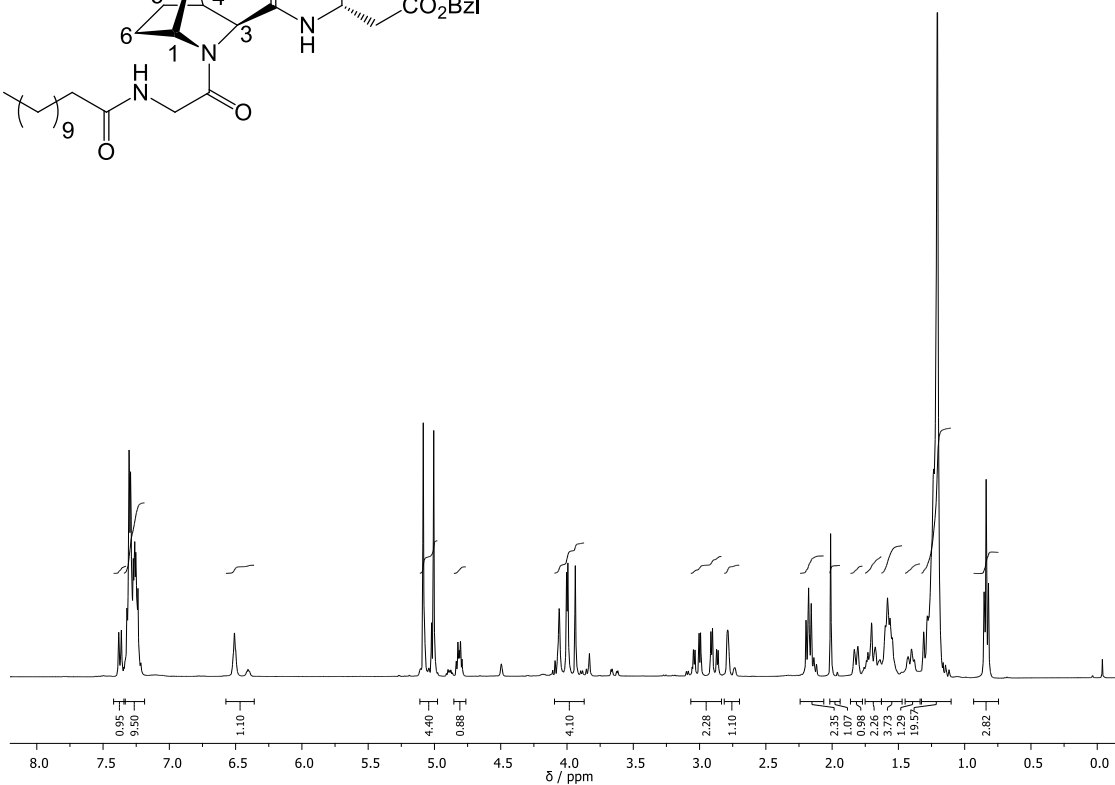
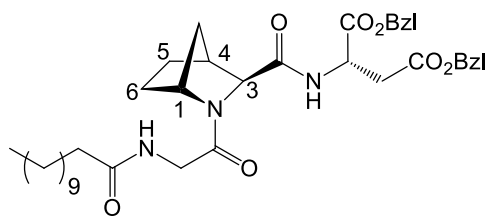
R_f: 0,46 em AcOEt

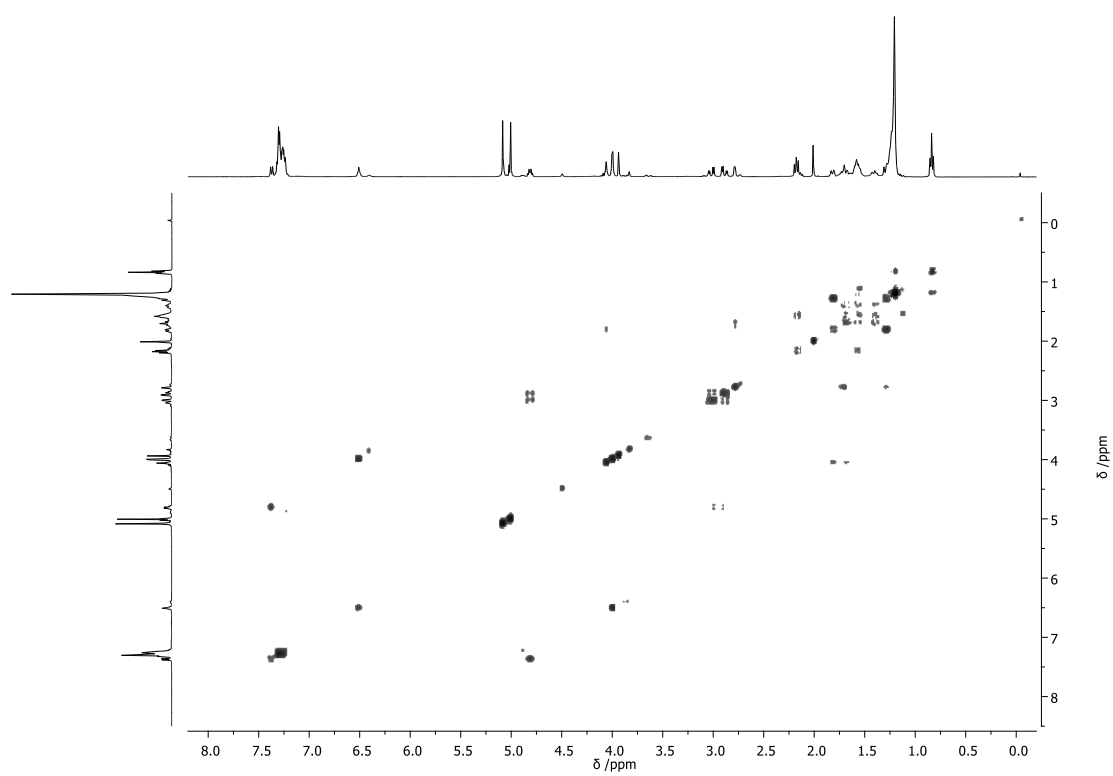
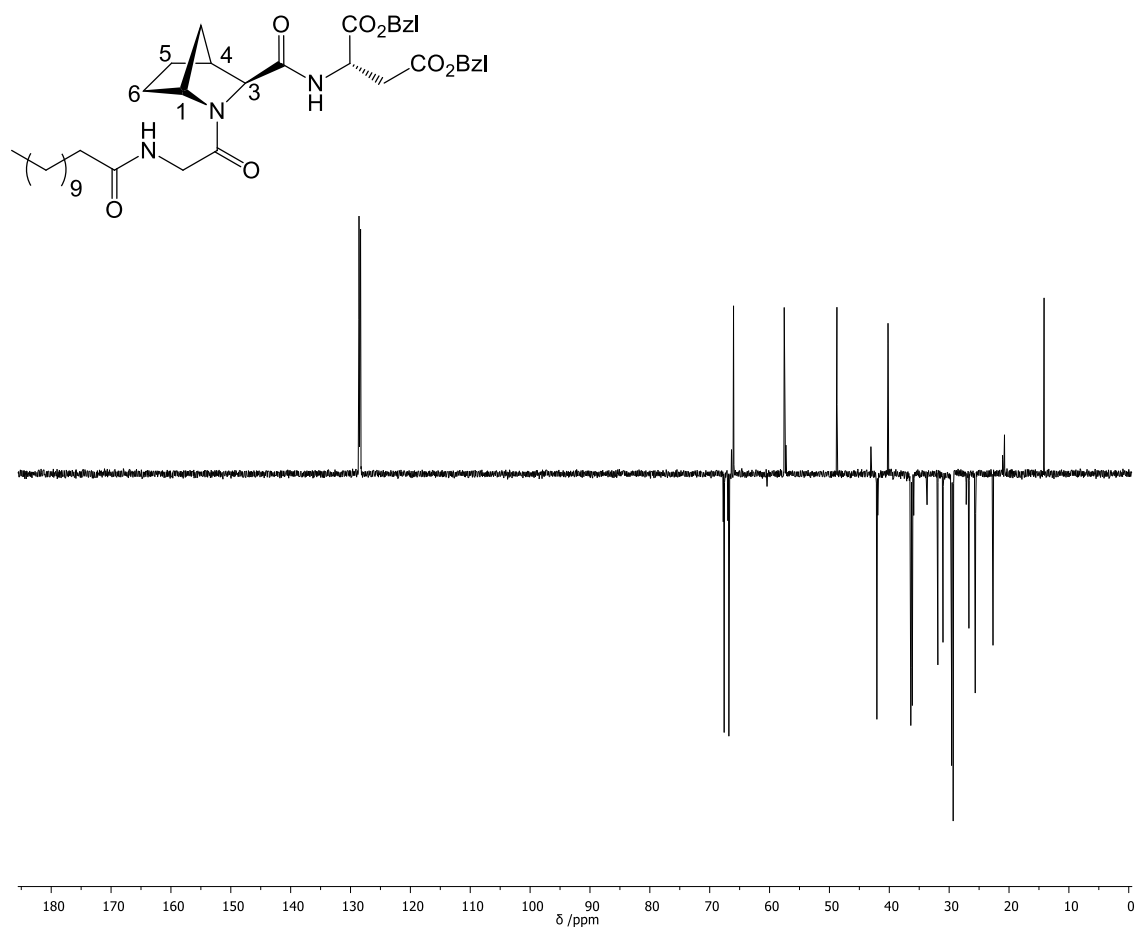
[α]_D²⁴ = − 102 (c1, MeOH)

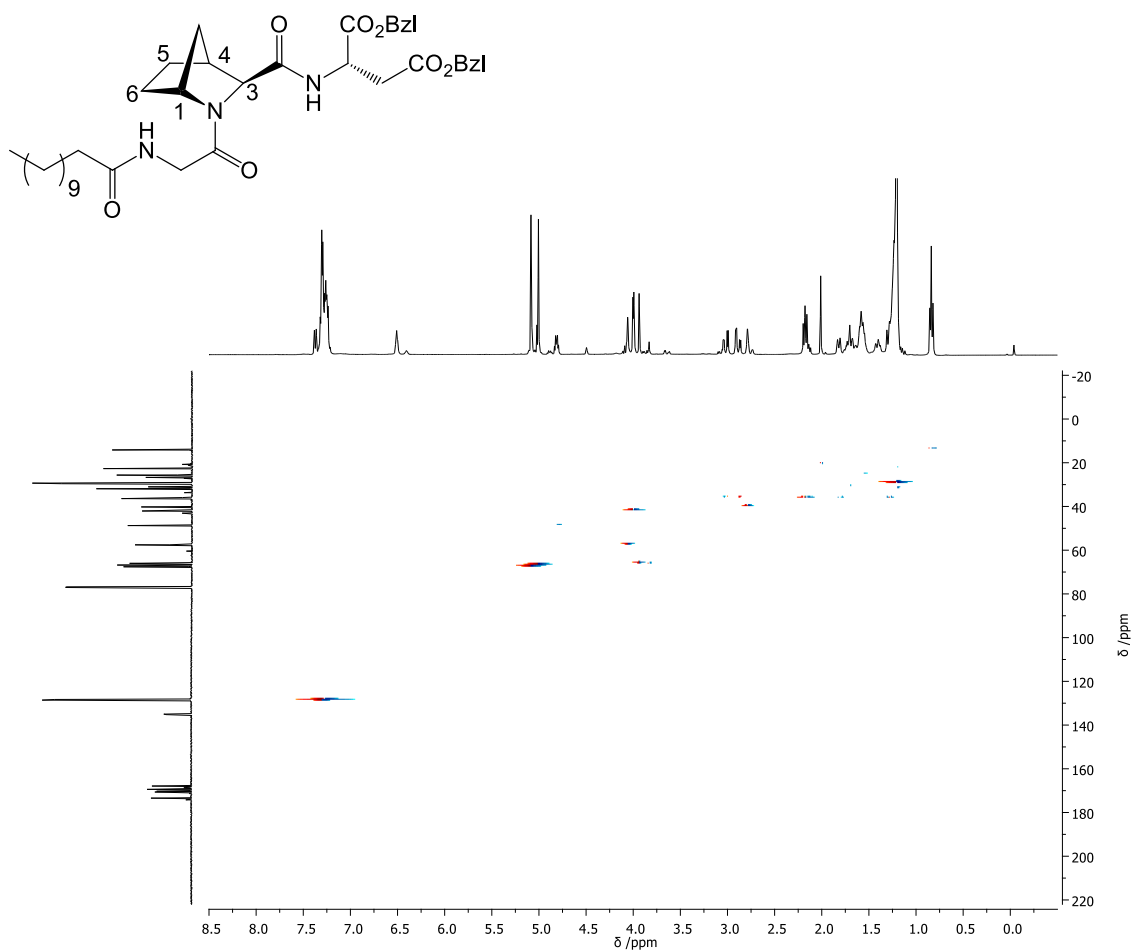
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,32–7,17 (m, 10H, 2xPh); 6,57–6,34 (m, 1H, CONH); 5,14–4,95 (m, 4H, 2xCH₂Ph); 4,87–4,76 (m, 1H, H_{Asp-2}); 4,09–4,03 (m, 4H, H-1, H-3, H_{Gly-2}); 3,10–2,84 (m, 2H, H-4); 1,32–1,12 (m, 16H, (CH₂)₈); 0,84 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [173,42 (C), 170,65 (C), 170,26 (C), 169,40 (C), 167,89 (C), CONH + CON + COOPh]; 135,05 (Ph); 129,32 – 127,74 (Ph); 67,66 (CH₂, CH₂OPh); 68,80 (CH₂, CH₂OPh); 66,02 (CH, C-3); 57,41 (CH, C-1); 48,75 (CH, C_{Asp-2}); 42,00 (CH₂, C_{Gly-2}); 40,21 (CH, C-4); 14,15 (CH₃, CH₃)

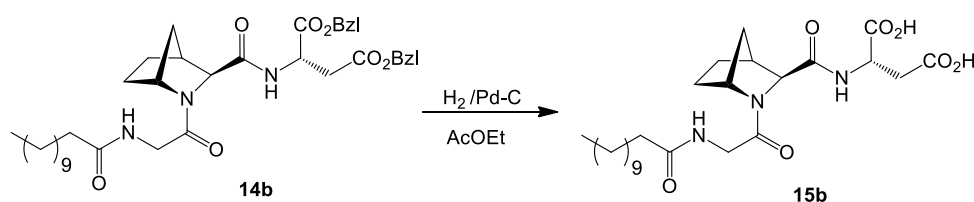
EM (ESI): *m/z* calculado para [M]⁺ 676,39, obtido 676,39







4.2.8 Síntese de ácido [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroilglicil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-aspártico



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **15a** (secção 4.3.6.), procedeu-se à hidrogenólise do tripéptido **14b** (0,110 g, 0,170 mmol) num ambiente saturado de H₂ durante 4 horas.

Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida originando-se um óleo amarelo (**15b**) (0,060 g). O rendimento da reação foi de 71,5 %.

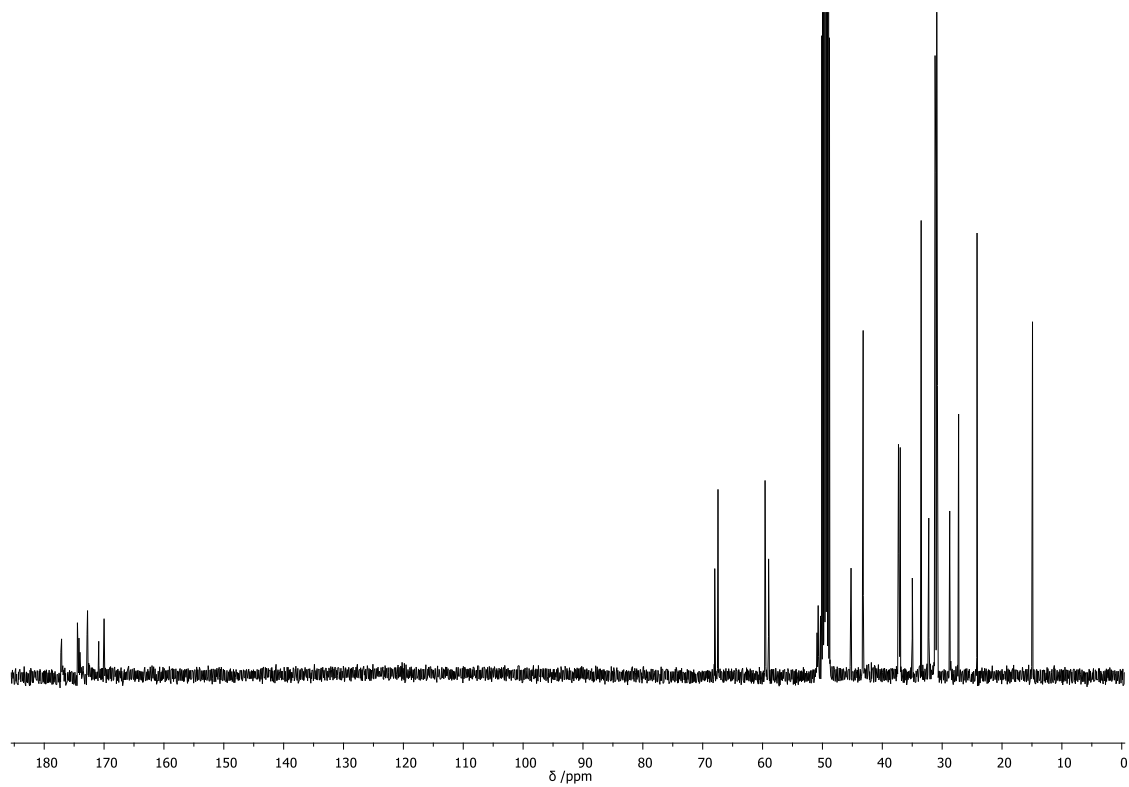
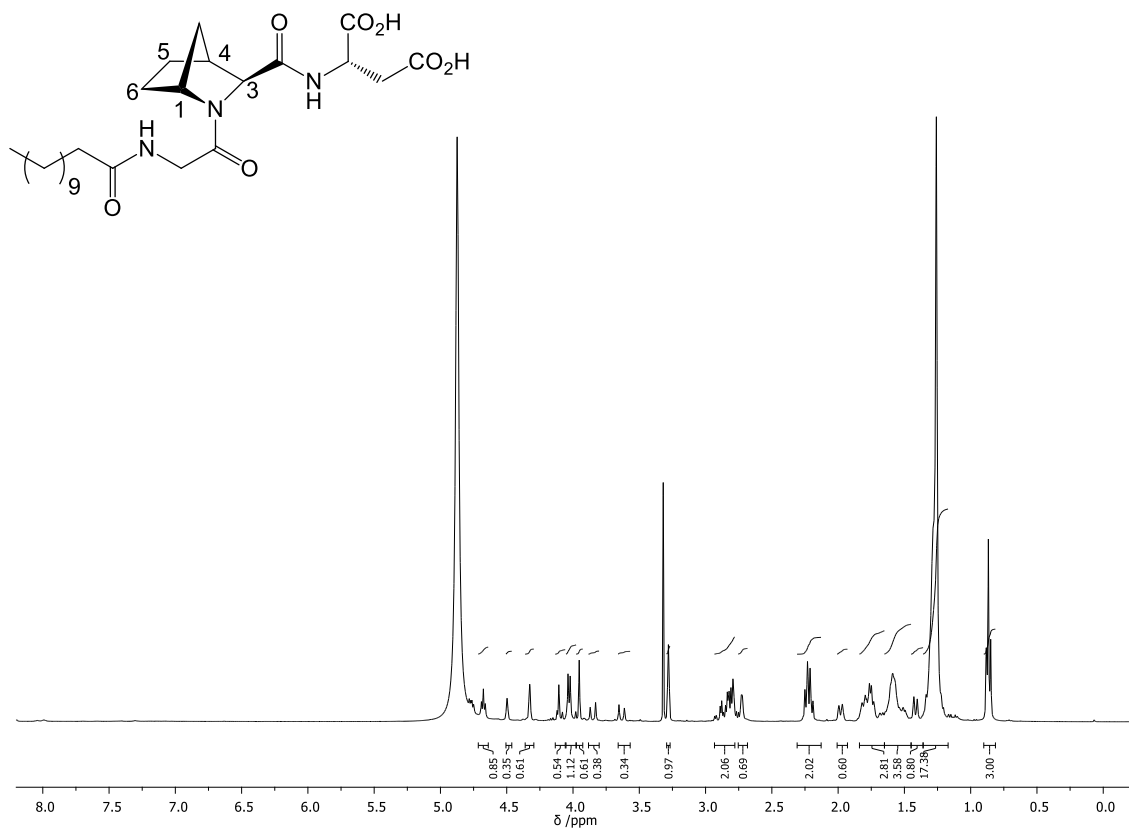
Composto: óleo amarelado

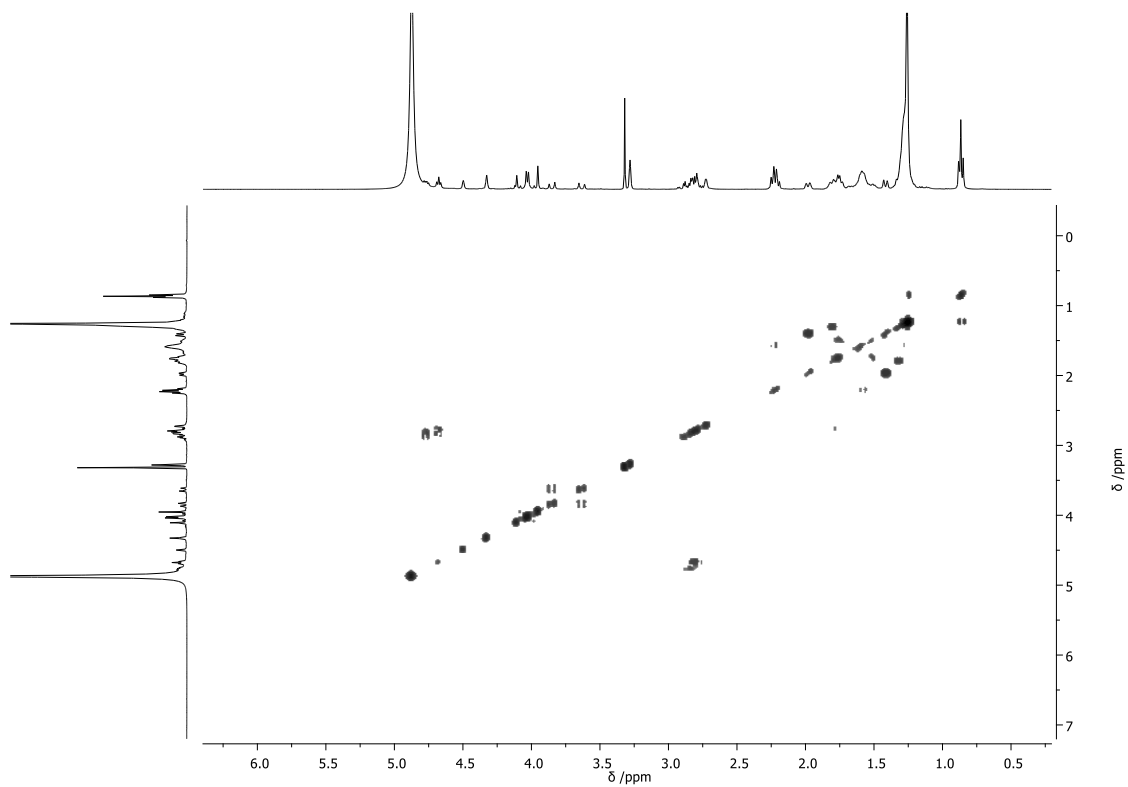
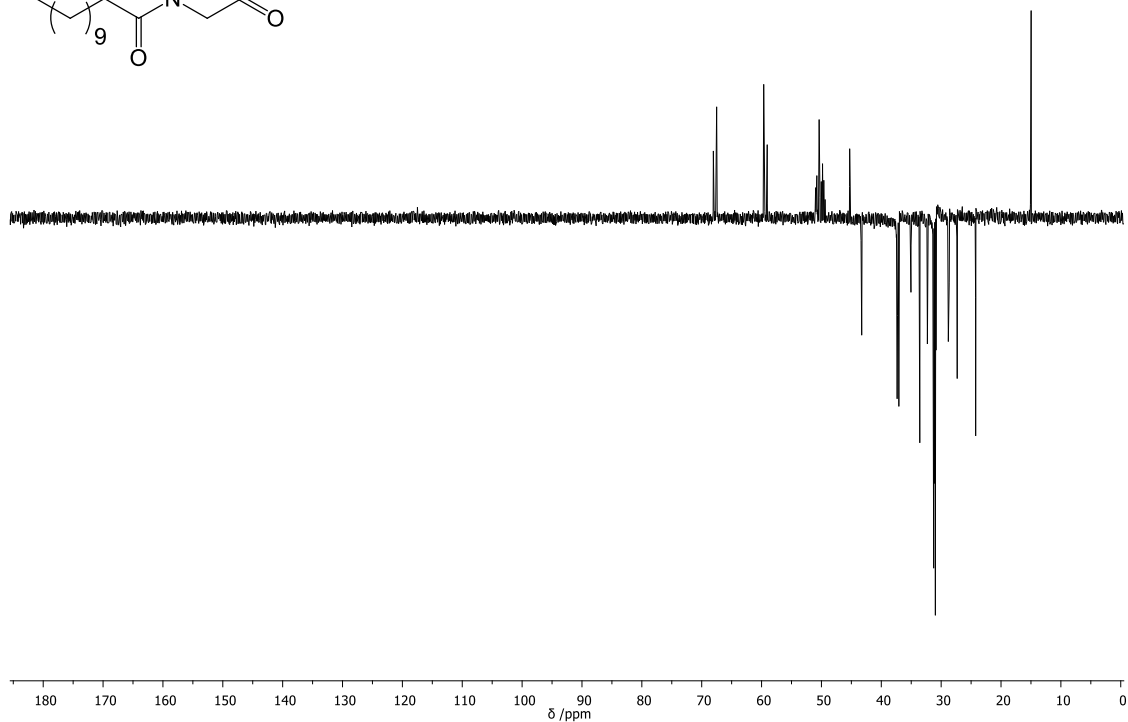
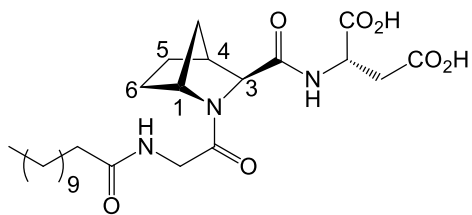
$$[\alpha]_D^{24} = -42 \text{ (c1, MeOH)}$$

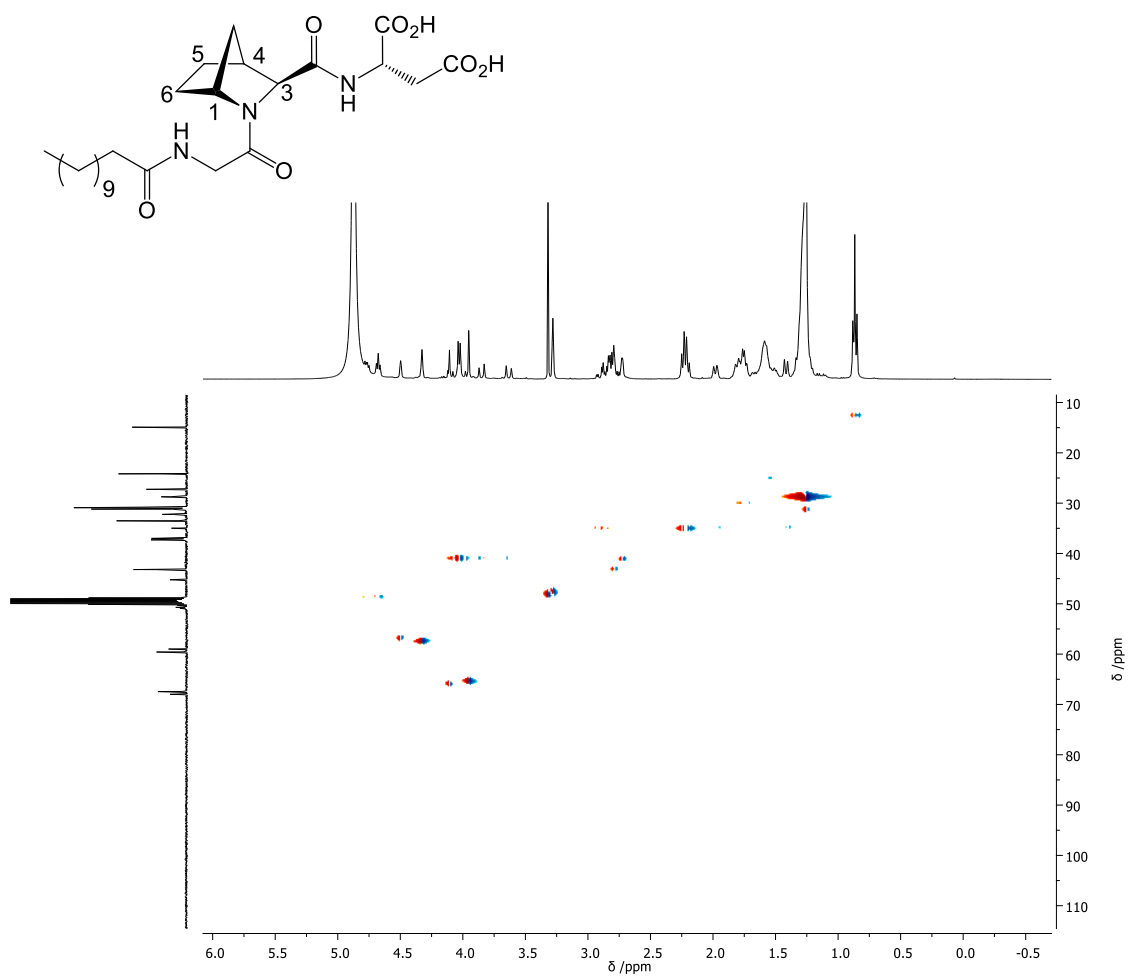
¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ: 4,68 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H, H_{Asp-2}); 4,50–4,33 (s, 1H, H-1); 4,13–4,01 (m, 2H, H-3 + H_{Gly-2}); 4,01–3,94 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H, H_{Gly-2}); 3,28 (s, 1H); 2,94–2,75 (m, 2H, H_{Asp-3}); 2,73 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-4); 2,29–2,14 (m, 2H); 2,04–1,91 (m, 1H); 1,86–1,68 (m, 3H); 1,66–1,45 (m, 4H); 1,39 (dd, *J* = 21,0, 5,9 Hz, 1H); 1,36–1,13 (m, 16H, (CH₂)₈CH₃); 0,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, (CH₂)₈CH₃)

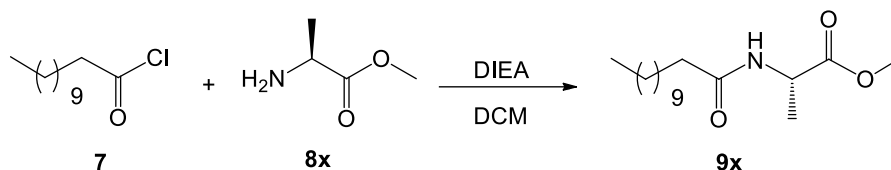
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, MeOD) δ: [177,10 (C), 174,45 (C), 172,80 (C), 172,89 (C), 170,00 (C), CONH + COOH + CON]; 67,72 (CH, C-3); 59,29 (CH, C-1); 49,47 (CH, C_{Asp-1}); 45,22 (CH, C-4); 43,27 (CH₂, C_{Gly-2}); 14,90 (CH₃, CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M][−] 494,29; obtido 494,30







4.2.9 Síntese de *N*-lauroil-L-alaninato de metilo

Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **9w** (secção 4.3.1.), procedeu-se á condensação do cloreto de lauroílo (**7**) com a alanina esterificada (**8x**) (1,00 g; 7,11 mmol) durante 5h. Posteriormente, realizou-se o tratamento corrente obtendo-se um composto branco (**9x**) (2,15 g). O rendimento da reação foi de 95,0 %.

Composto: sólido branco

R_f: 0,87 em AcOEt

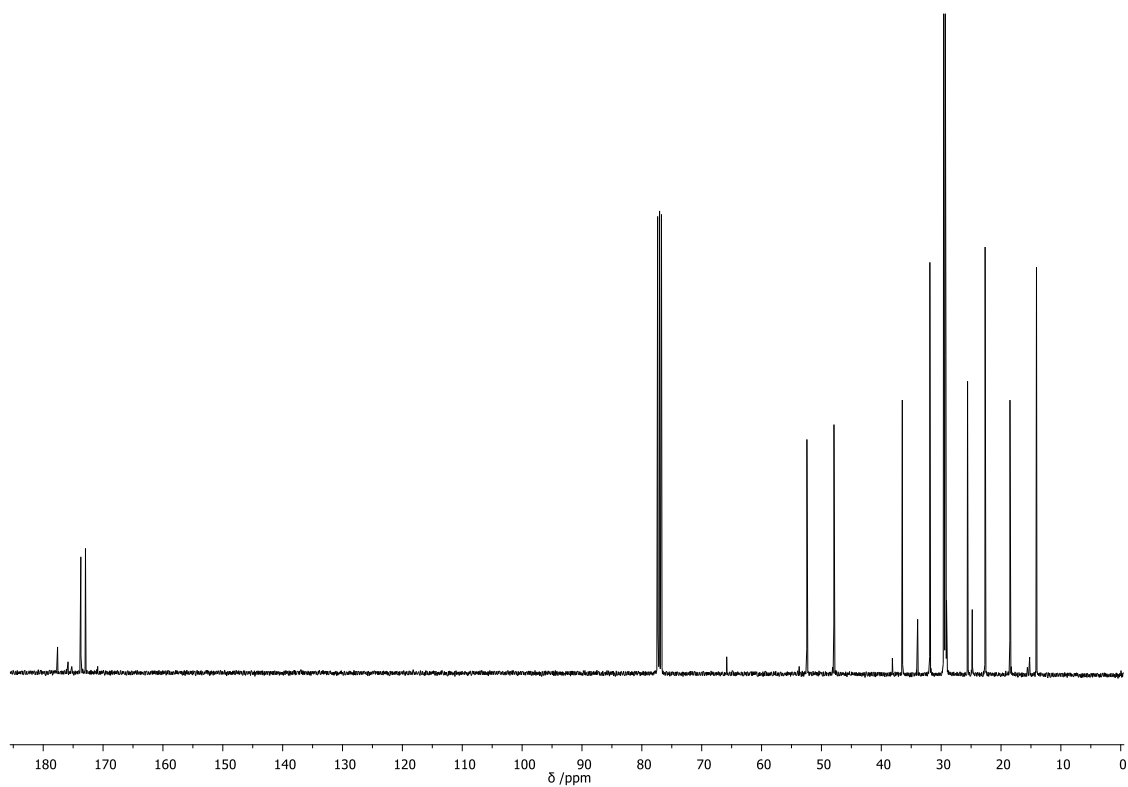
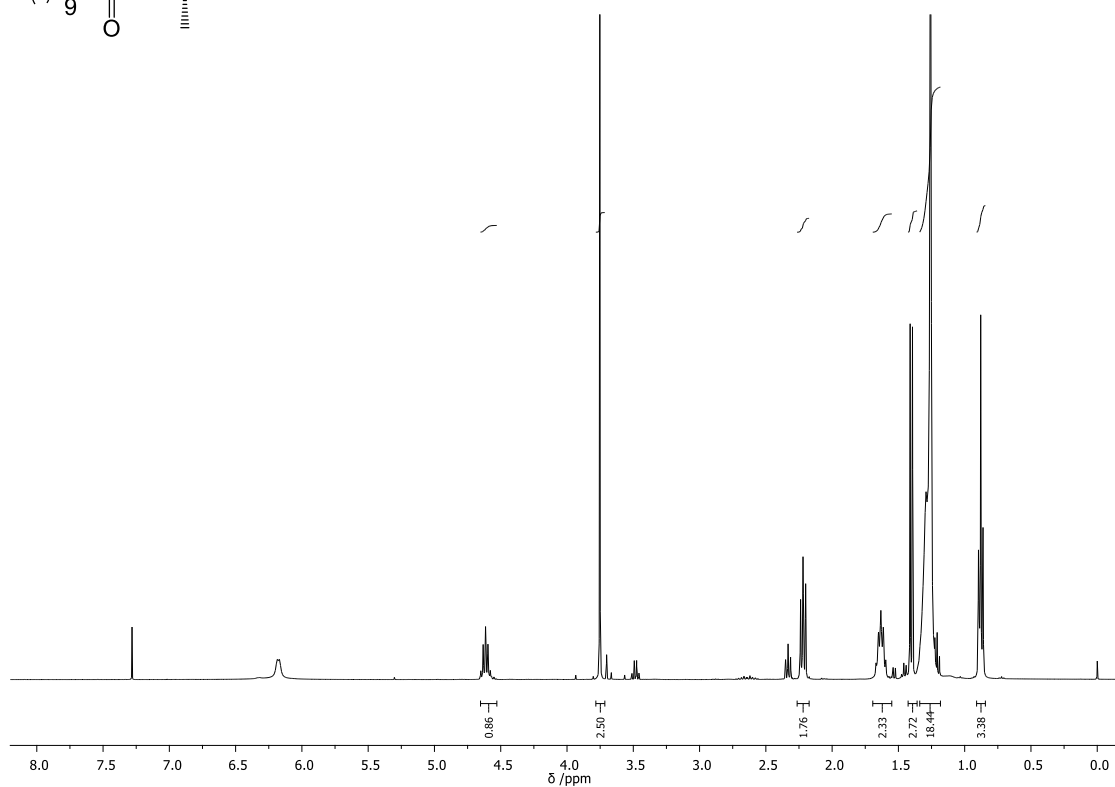
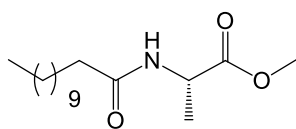
P.f.: 55 °C

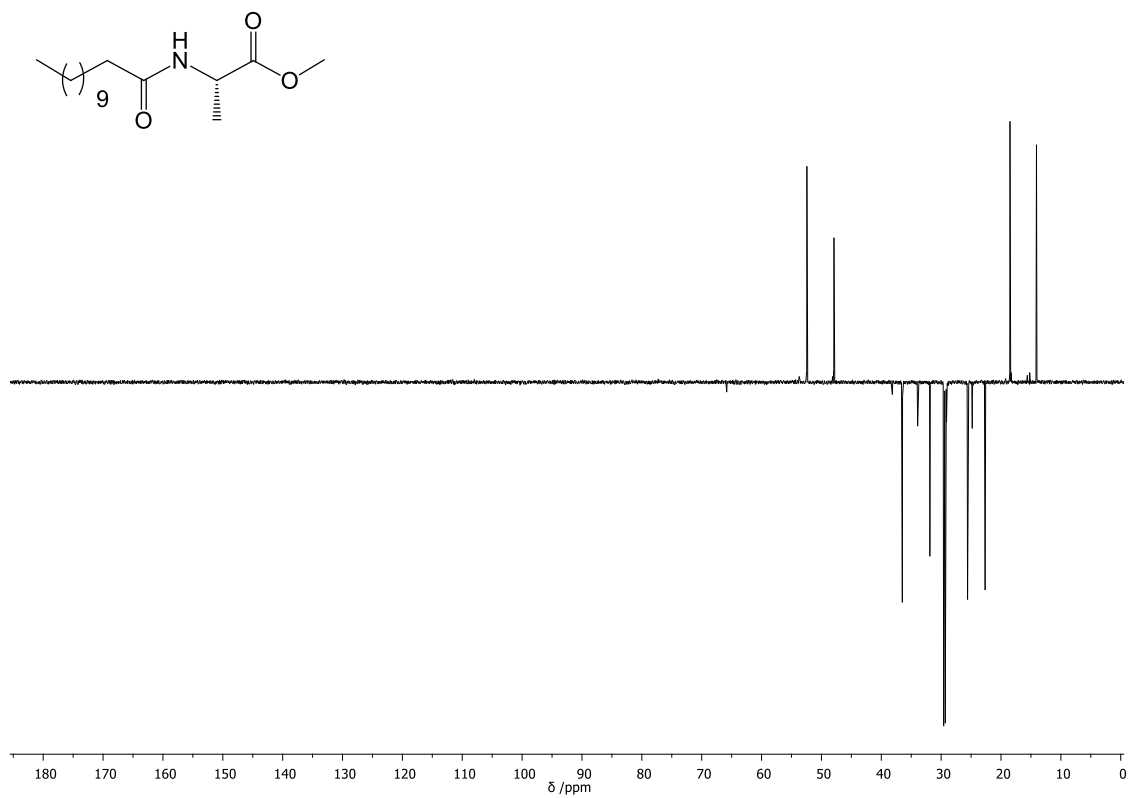
[α]_D²⁴ = − 32 (c1, MeOH)

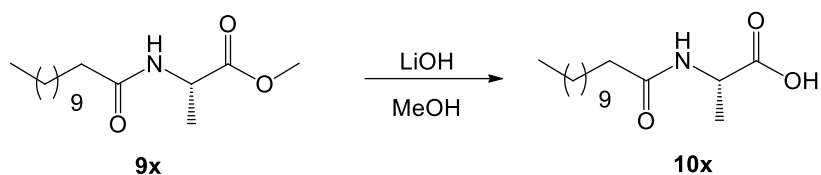
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 6,18 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H, NH); 4,67 – 4,55 (m, 1H, CH(CH₃)); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 2,26 – 2,18 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, NHCOCH₂); 1,69 – 1,58 (m, 2H); 1,40 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH(CH₃)); 1,36 – 1,18 (m, 18H, (CH₂)₉); 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, (CH₂)₉CH₃);

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [173,71 (C), 172,94 (C). COOCH₃ + CONH]; 53,07 (CH₃, COOCH₃); 47,91 (CH, CH(CH₃)); 36,49 (CH₂, NHCOCH₂); 18,50 (CH₃, CH(CH₃)); 14,65 (CH₃, (CH₂)₈CH₃);

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 286,23, obtido 286,24





4.2.10 Síntese de *N*-lauroil-L-alina

Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **10w** (secção 4.3.2.), procedeu-se á hidrólise do composto **9x** (0,650 g; 2,30 mmol) utilizando LiOH durante 4h e, posteriormente, realizou-se o tratamento corrente. Obteve-se um composto branco (**10x**) (0,600 g) e o rendimento da reação foi de 96,1%.

Composto: sólido branco

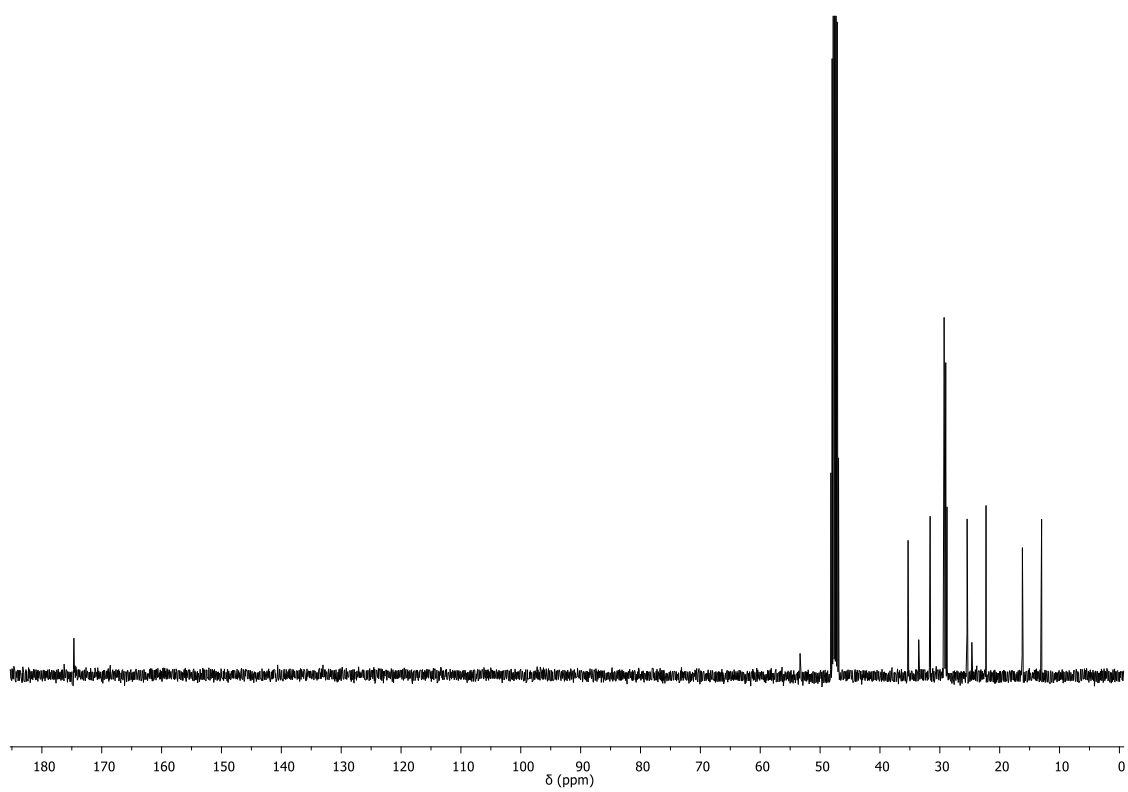
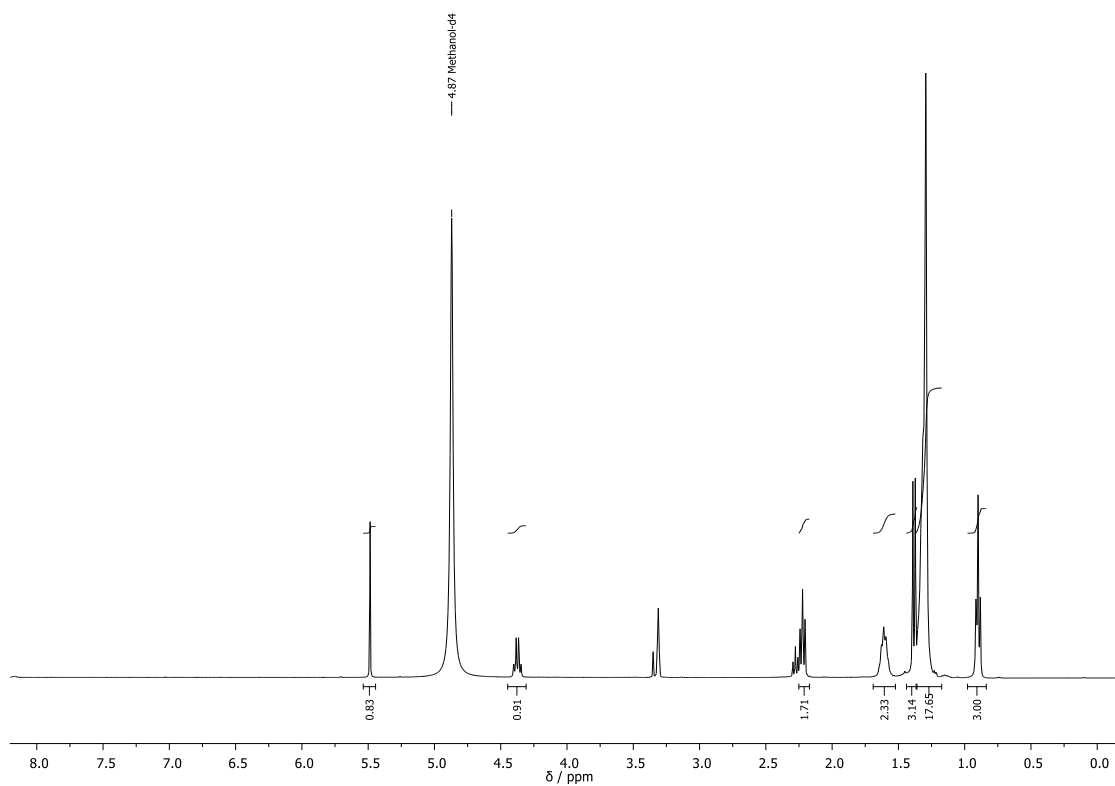
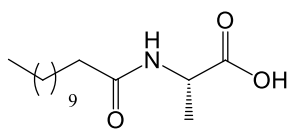
P.f.: 75 – 77 °C

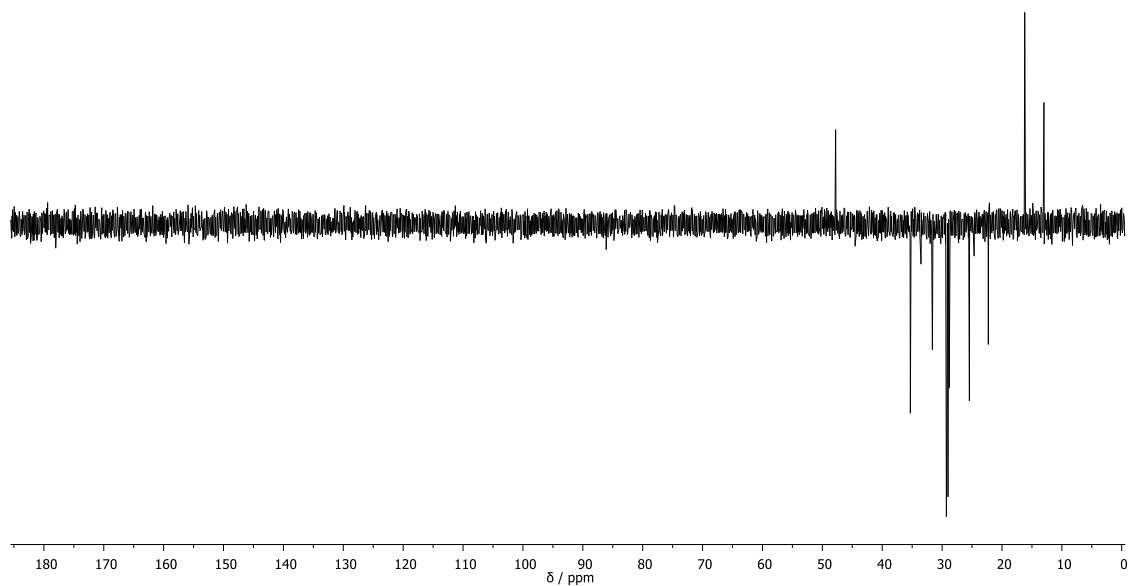
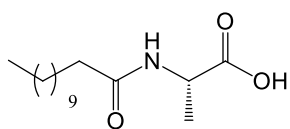
$[\alpha]_D^{24} = -22$ (c1, MeOH)

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ: 5,49 (s, 1H, NH); 4,37 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H, H_{Ala-2}); 2,21 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, NHCOCH₂); 1,69 – 1,52 (m, 2H); 1,37 (t, $J = 6,1$ Hz, 3H, H_{Ala-3}); 1,30 (d, $J = 8,1$ Hz, 18H, (CH₂)₉); 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H, (CH₂)₉CH₃);

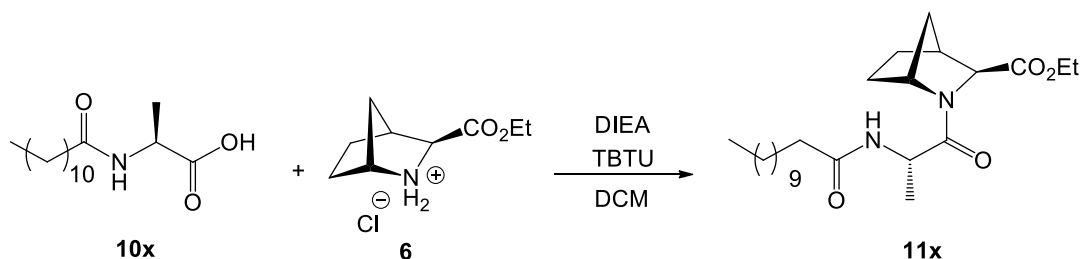
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [(174,71 (C), 174,66 (C), COOH + CONH)]; 47,56 (CH, C_{Ala-2}); 35,30 (CH₂, NHCOCH₂); 16,20 (CH₃, C_{Ala-3}); 13,00 (CH₃, (CH₂)₈CH₃);

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁻ 270,21, obtido 270,22





4.2.11 Síntese de (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carboxilato de etilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre **10x** (0,250 g; 0,97 mmol) e o biciclo (**6**) (0,300 g, 1,46 mmol, 1.5 eq.) durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**11x**) (0,260 g). O rendimento da reação foi de 63,6 %.

Composto: óleo amarelo

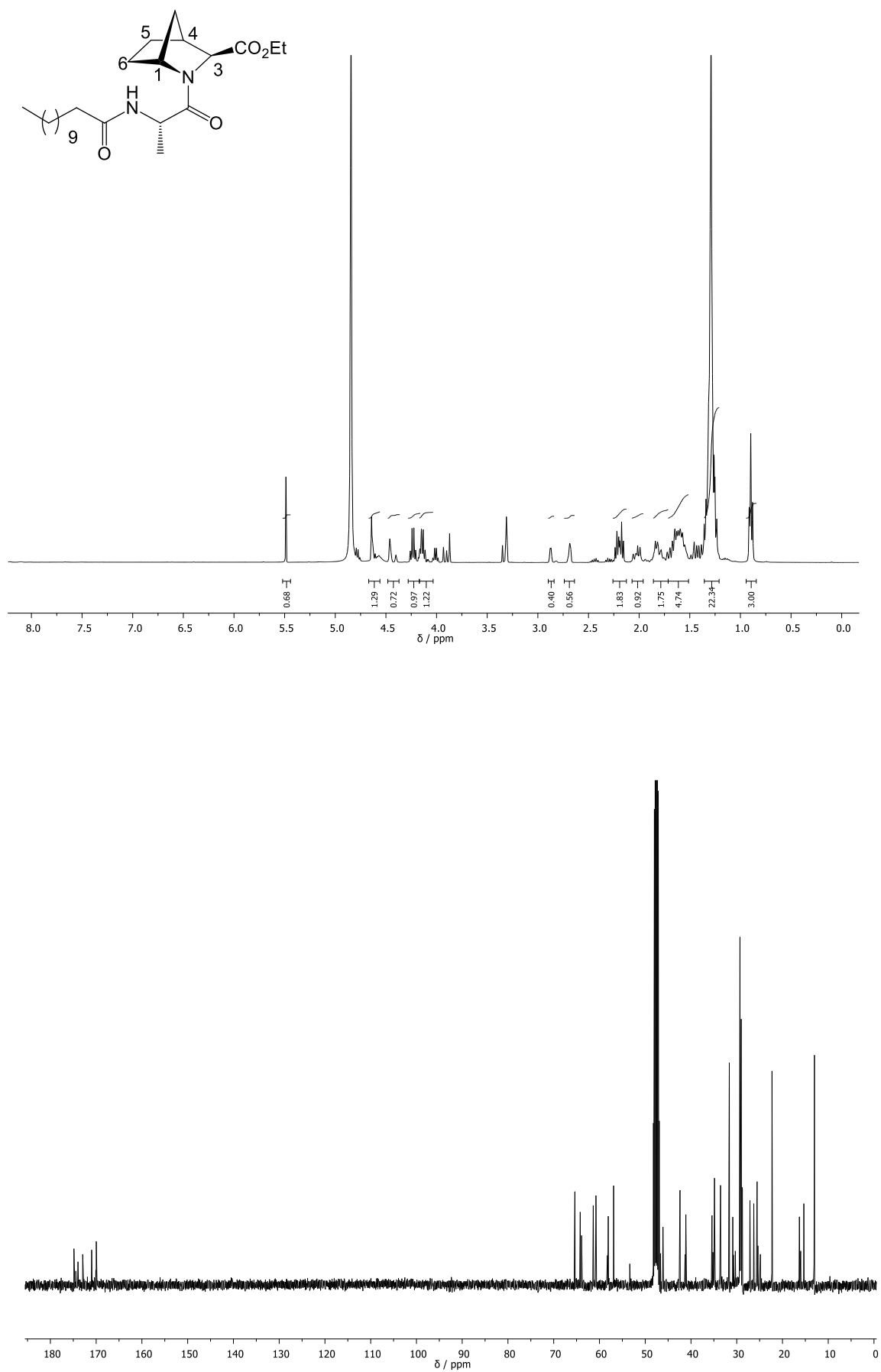
R_f: 0,59 em AcOEt

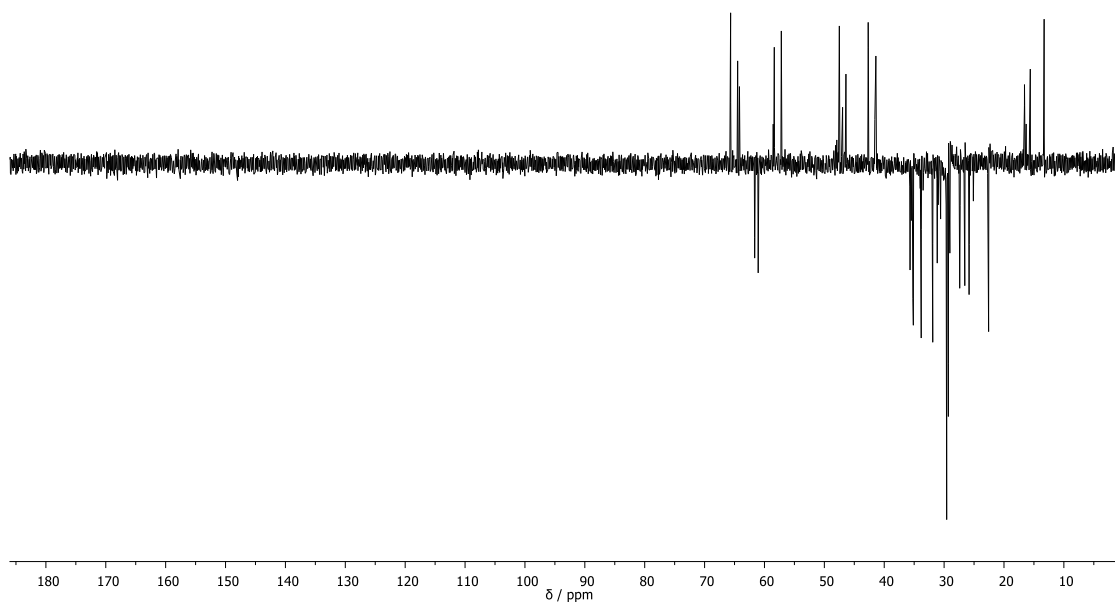
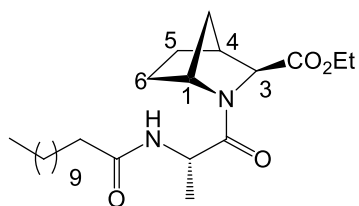
[α]_D²⁴ = – 136 (c1, MeOH)

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ(ppm): 5,46 (s, 1H, CONH); 4,65–4,47 (m, 2H, CO₂CH₂); 4,40 (d, *J* = 24,1 Hz, 1H, H-3); 4,25–4,16 (m, 1H, H_{Ala}-2); 4,15–4,02 (m, 1H, H-1); 2,83 (t, *J* = 10,9 Hz, 1H, H-4); 2,66 (s, 1H); 2,16 (dq, *J* = 22,2, 7,3 Hz, 2H); 1,85–1,68 (m, 1H); 1,68–1,47 (m, 3H, H_{Ala}-3); 1,26 (s, 23H, (CH₂)₉ + COOCH₂CH₃); 0,87 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H, CH₃)

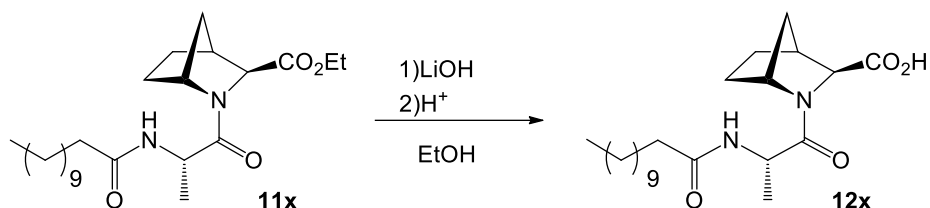
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, MeOD) δ: [174,86 (C), 172,94 (C), 169,98 (C), COOEt + CONH + CON]; 66,05–63,67 (CH, C-3); 61,06 (CH₂, COOCH₂); 58,26–55,92 (CH, C-1); 49,56–45,31 (CH, C_{Ala}-2); 42,40 (CH, C-4); 16,30 (CH₃, C_{Ala}-3); 15,33 (CH₃, COOCH₂CH₃); 13,05 (CH₃(CH₂)₈CH₃)

EM (ESI): *m/z* calculado para [M]⁺ 423,31, obtido 423,32





4.2.12 Síntese de (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carboxilato de etilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **12w** (seção 4.3.4.), procedeu-se á hidrólise do composto **11x** (0,430 g; 1,02 mmol) ao fazer-lo reagir com LiOH (0,147 g; 6,10 mmol; 6 eq) durante 5h. Posteriormente realizou-se o tratamento corrente e obteve-se um óleo amarelo (**12x**) (0,378 g). O rendimento da reação foi 94,1%.

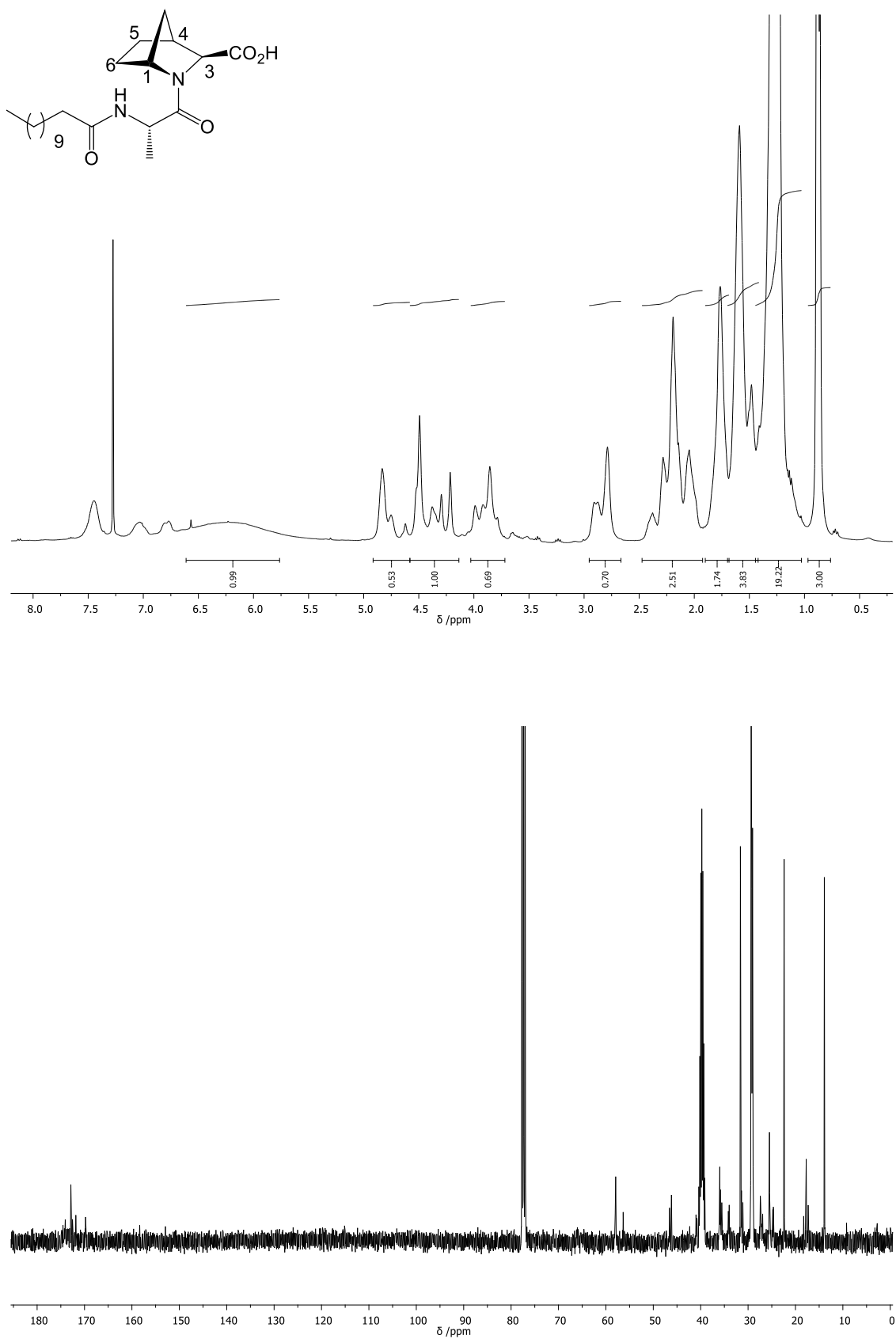
Composto: óleo amarelo

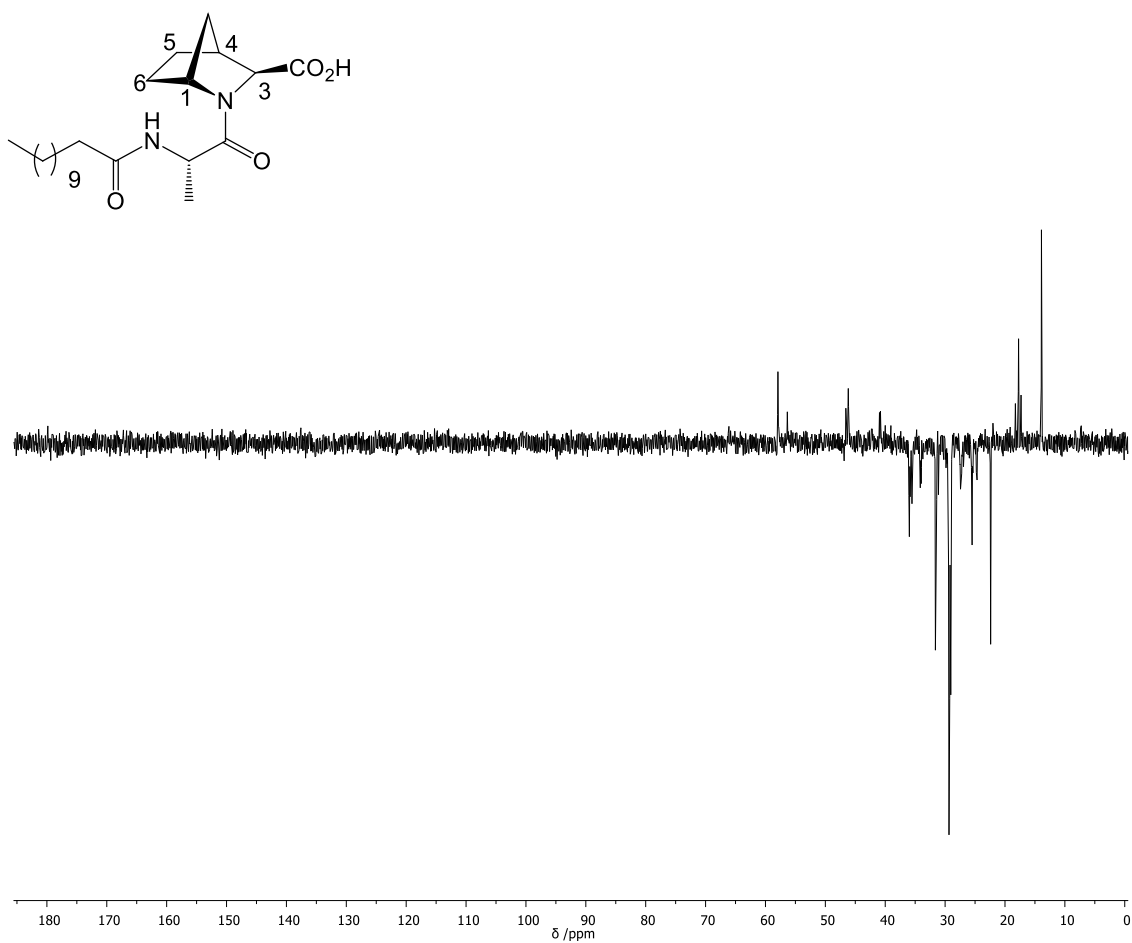
$[\alpha]_D^{24} = -73$ (*c*1, MeOH)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,40 (s, *J* = 36,8 Hz, 1H, CONH); 6,23 (s, 1H, COOH); 4,91 – 4,60 (m, 1H, H-1); 4,45 (d, *J* = 32,6 Hz, 1H, H_{Ala}-2); 4,40–4,12 (m, 1H, H-3); 3,89 (dd, *J* = 53,2, 28,2 Hz, 1H); 3,00 – 2,69 (m, 1H, H-4); 2,47–1,93 (m, 3H); 1,72 (d, *J* = 32,1 Hz, 2H); 1,67–1,44 (m, 4H); 1,33 (d, *J* = 65,2 Hz, 16H, (CH₂)₈CH₃); 0,88 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H, CH₃)

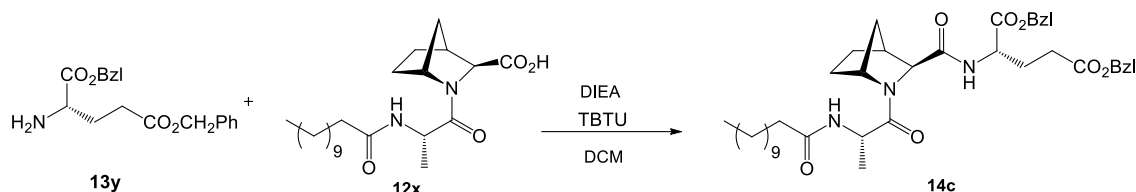
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [172,88 (C), 172,09–171,38 (C), 170,02–169,44 (C), COOH + COONH + CONH]; 57,92 (CH, C-3); 56,35 (CH, C-1) 46,17 (CH, C_{Ala}-2); 40,88 (CH, C-4) 17,73 (CH₃, C_{Ala}-3); 13,91 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

EM (ESI): *m/z* calculado para [M][−] 393,28, obtido 393,28





4.2.13 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-glutamato de dibenzilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o dipéptido **12x** (0,250 g; 0,97 mmol) e (S)-dibenzil hidrocloreto de 2-aminopentanedioate (**13y**) durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações e evaporou-se o solvente, obtendo-se um óleo amarelado (**14c**) (0,500 g). O rendimento da reação foi de 73,7 %.

Composto: óleo amarelado

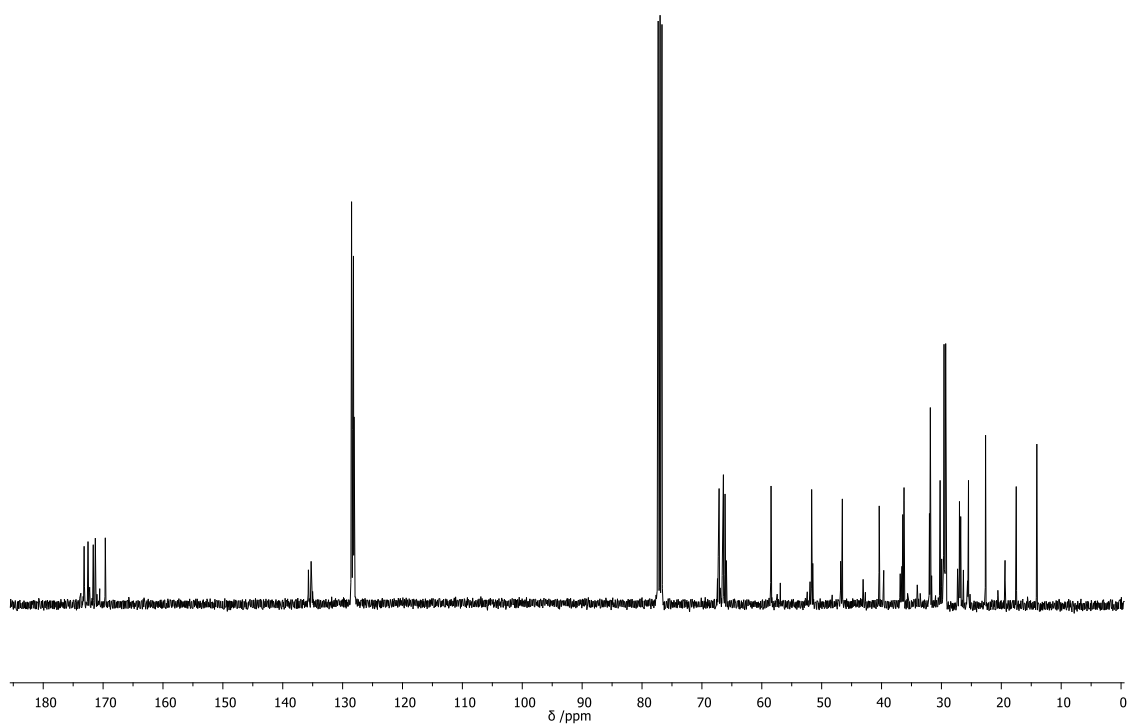
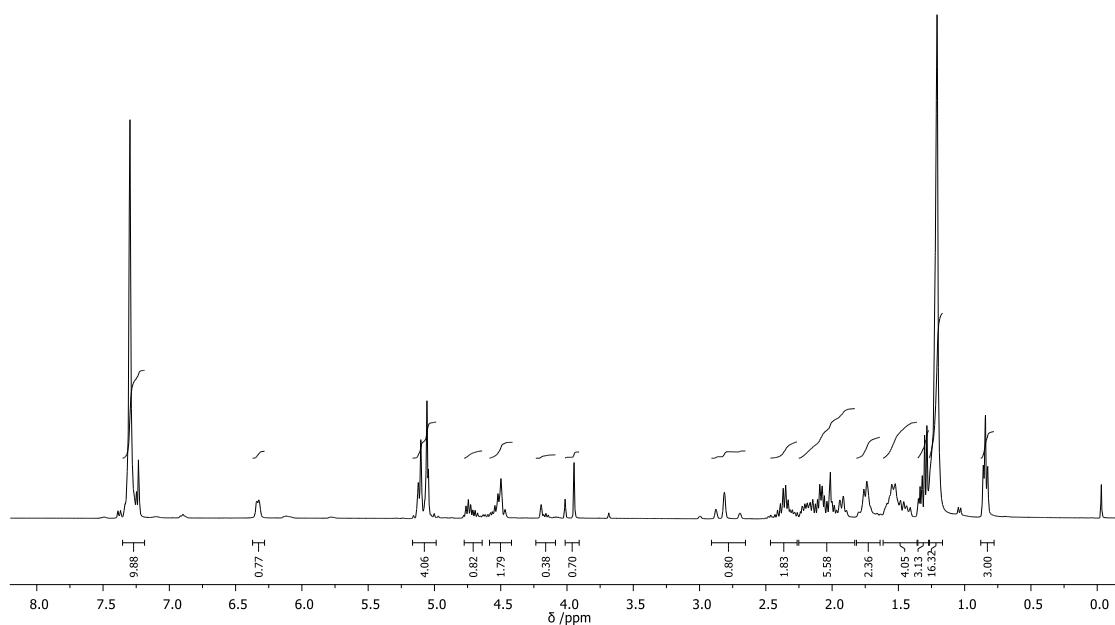
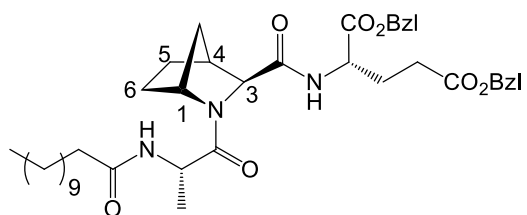
R_f: 0,54 em AcOEt/ Hex (5:1)

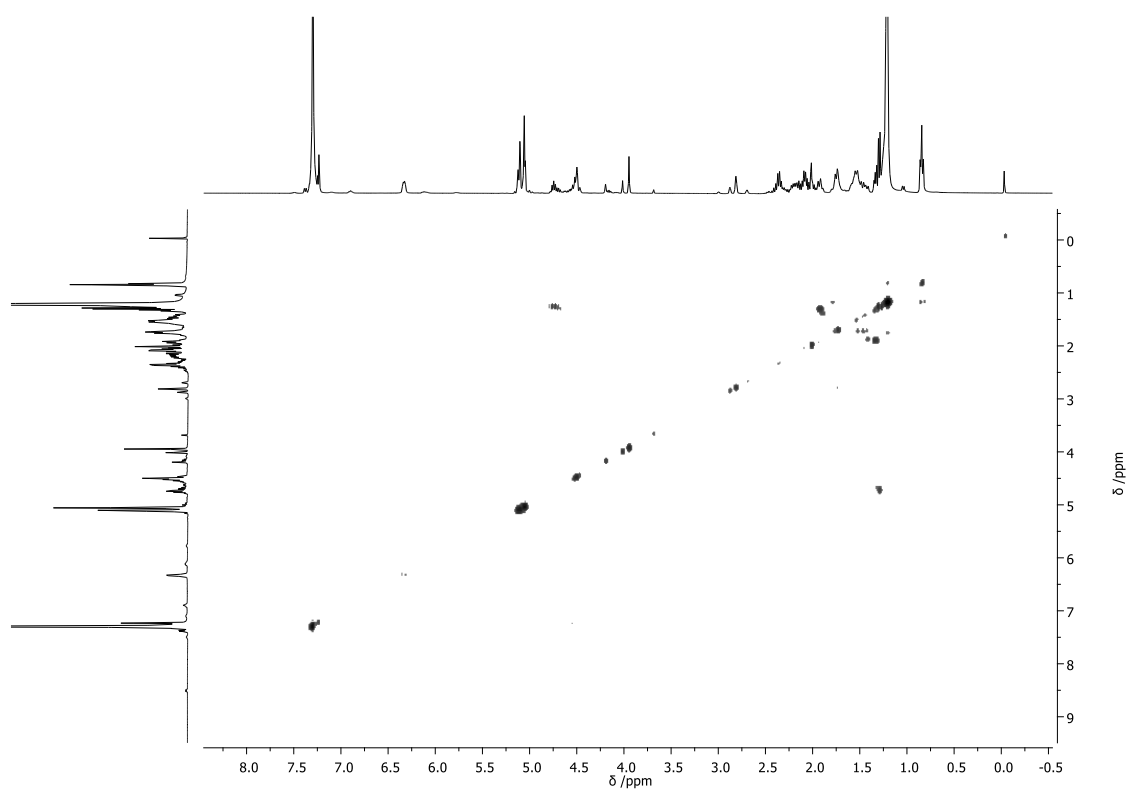
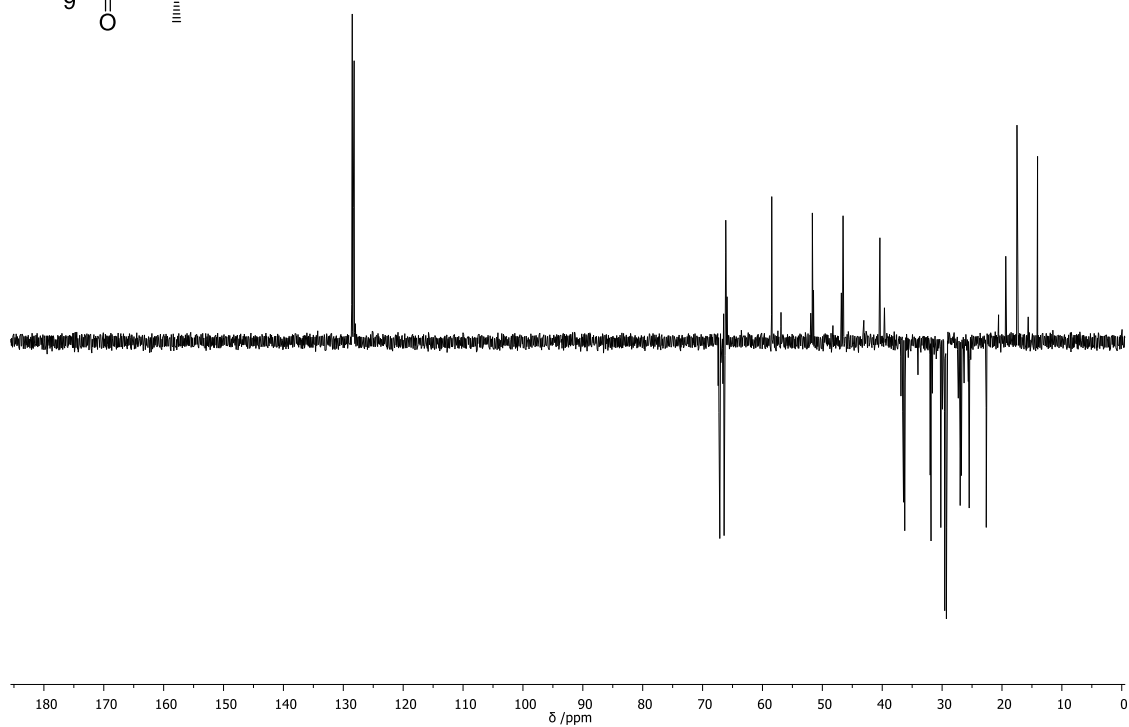
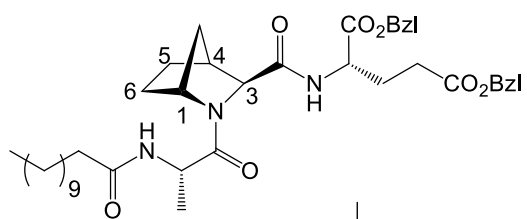
[α]_D²⁴ = – 63 (c1, MeOH)

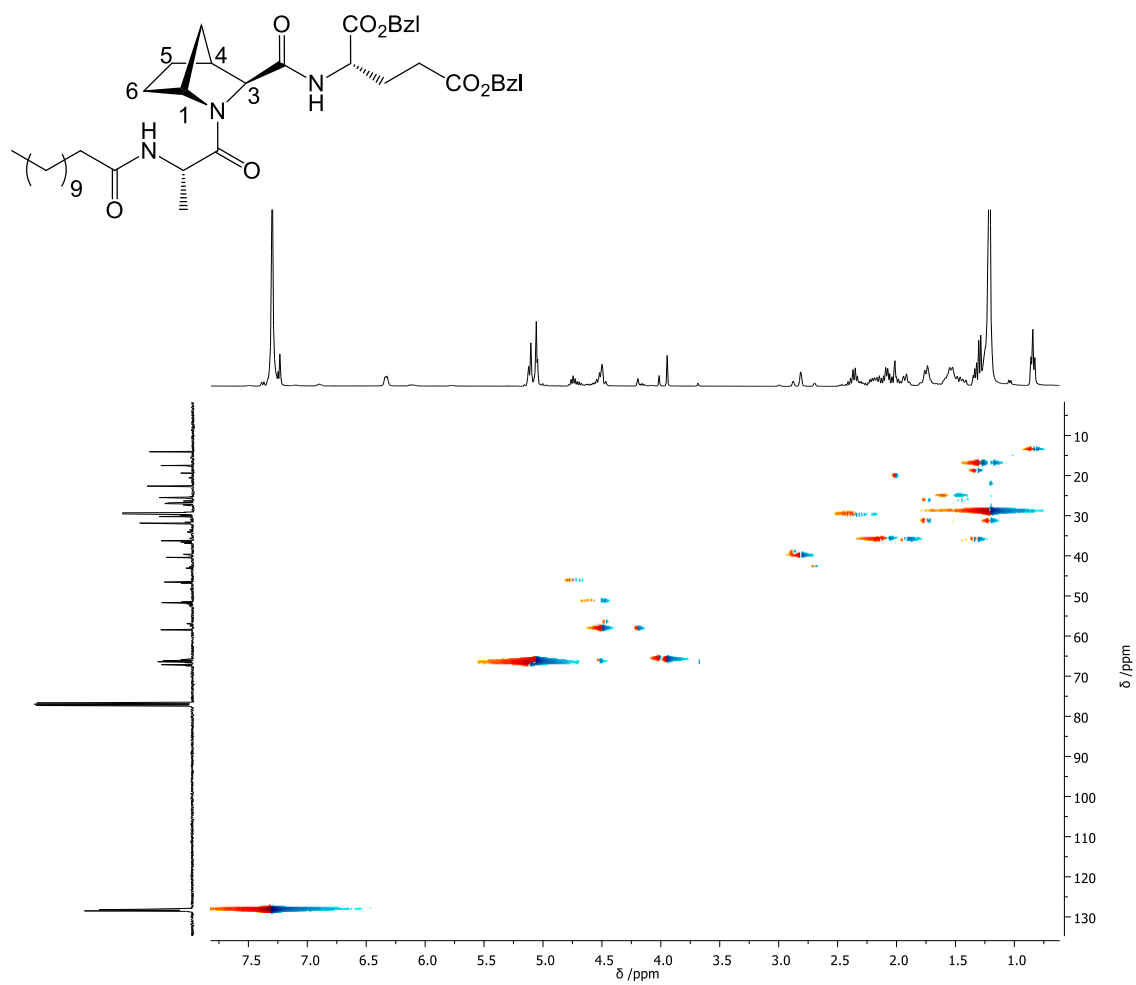
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,40–7,18 (m, 10H, 2xPh); 6,33 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H, CONH); 5,14–5,00 (m, 4H, 2xCH₂OPh); 4,80–4,63 (m, 1H, H_{Glu-2}); 4,63–4,43 (m, 2H, H-1 + H_{Ala-2}); 3,98 (d, *J* = 27,0 Hz, 1H, H-3); 2,76 (d, *J* = 25,6 Hz, 1H, H-4); 2,44–2,22 (m, 2H); 2,22–1,87 (m, 5H); 1,81–1,64 (m, 2H); 1,50 (dd, *J* = 29,6, 17,0, 9,4 Hz, 4H); 1,36–1,27 (m, 3H, H_{Ala-3}); 1,21 (s, 16H, (CH₂)₈CH₃); 0,84 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H, (CH₂)₈CH₃)

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: [173,17 (C), 172,52 (C), 171,65 (C), 171,30 (C), 169,63 (CO), COOPh + CONH + CON]; 135,71 (Ph); 135,26 (Ph); 128,71–127,98 (Ph); 67,13–66,41 (CH₂, CH₂OPh); 66,14 (CH, C-3); 58,45 (CH, C-1); 51,70 (CH, C_{Ala-2}); 46,69 (CH, C_{Glu-2}); 40,39 (CH, C-4); 17,51 (CH₃, C_{Ala-2}(CH₃)); 14,07 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

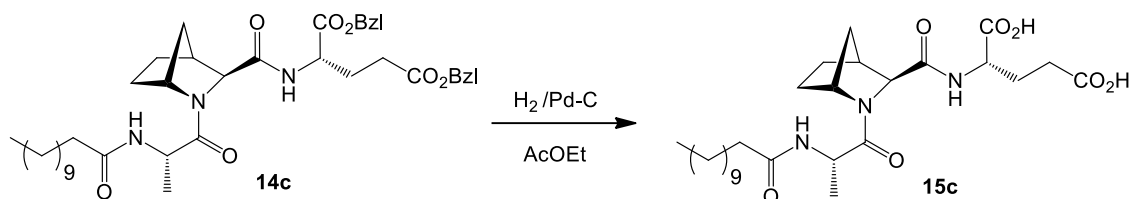
EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 704,42, obtido 704,43







4.2.14 Síntese de ácido [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-glutâmico



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **15a** (seção 4.3.6.), procedeu-se à hidrogenólise do tripéptido **14c** (0,200 g, 0,296 mmol) num ambiente saturado de H₂ durante 4 horas.

Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida originando-se um óleo amarelo (**15c**) (0,100 g). O rendimento da reação foi de 64,0%.

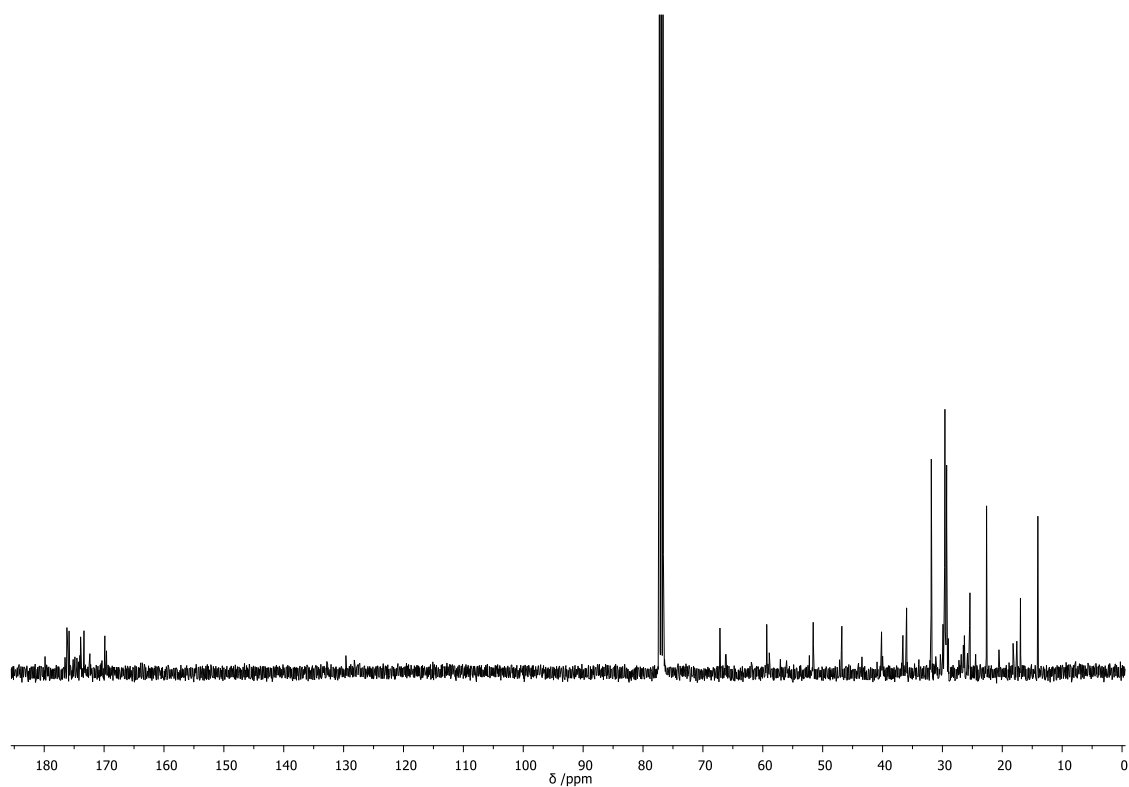
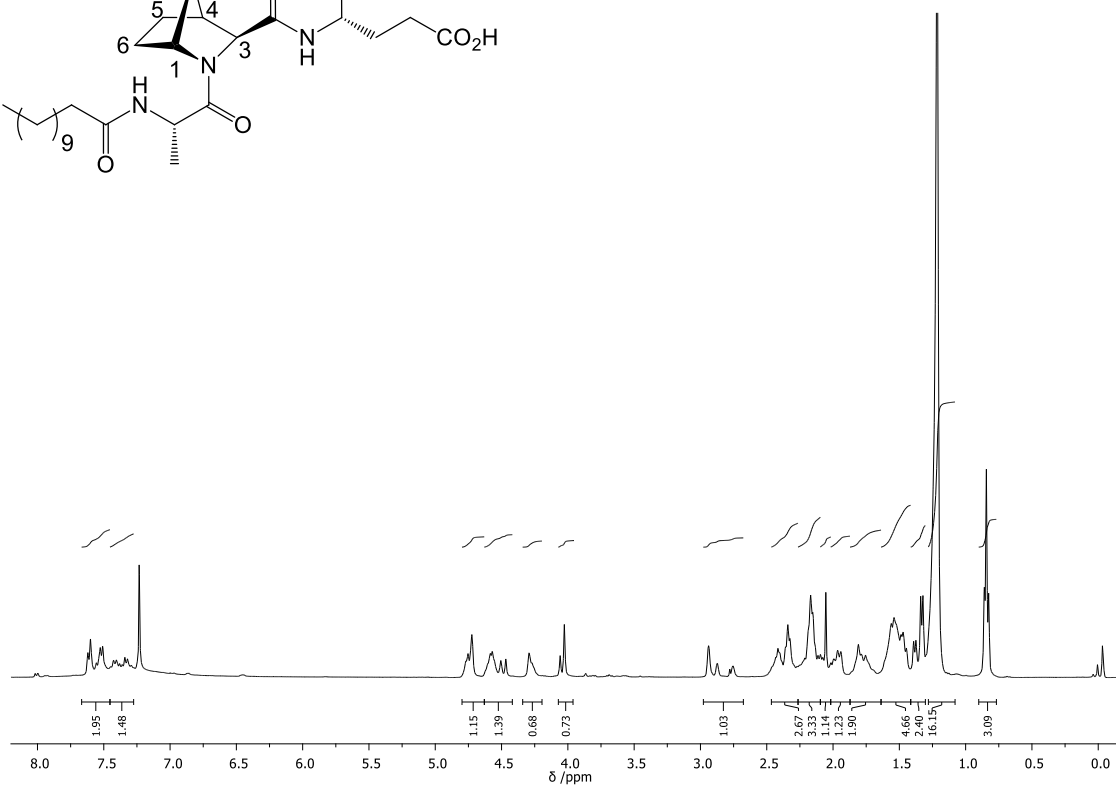
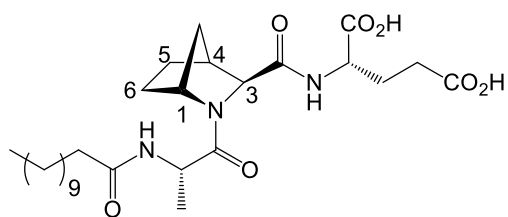
Composto: óleo amarelado

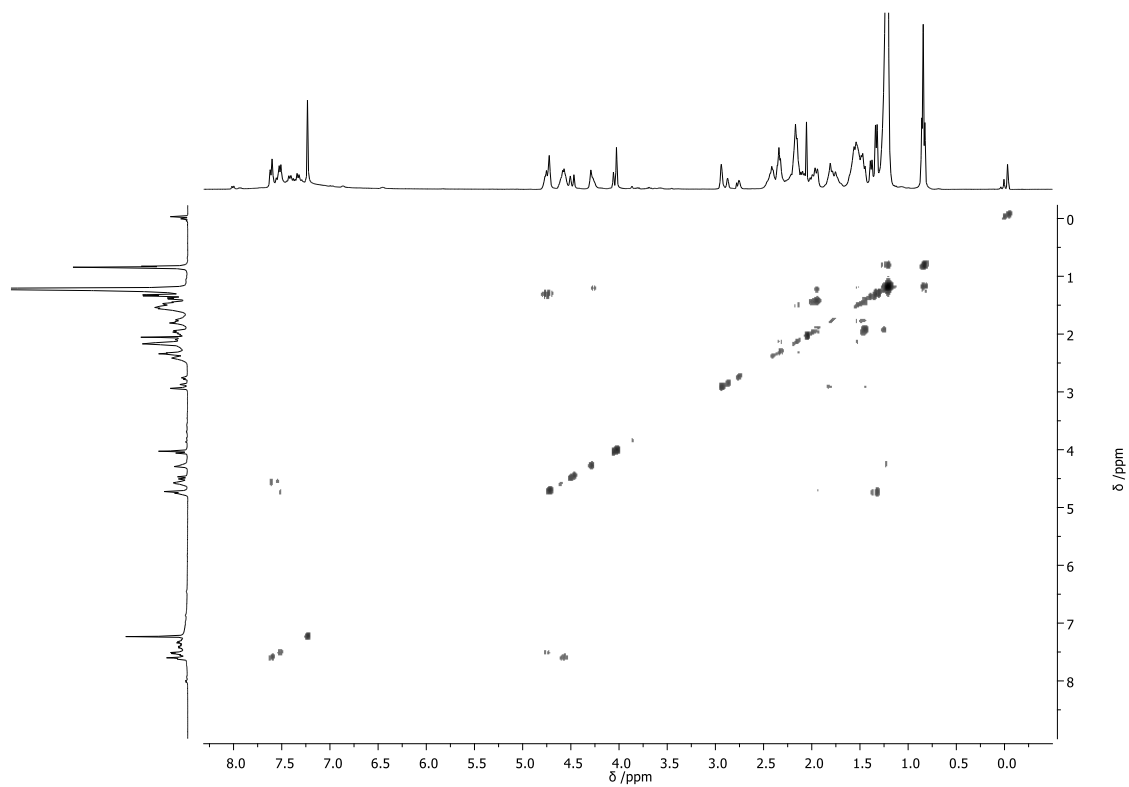
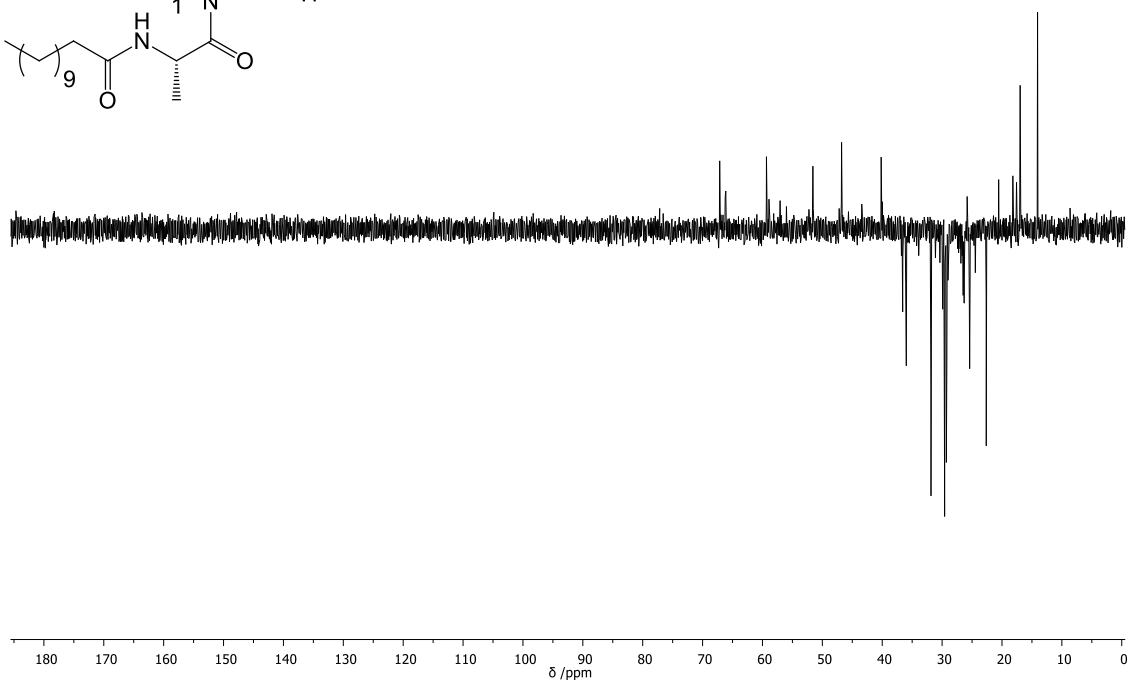
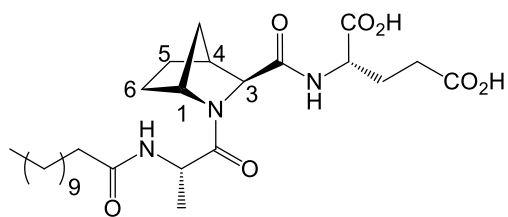
$$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -24,9 \text{ (c1, MeOH)}$$

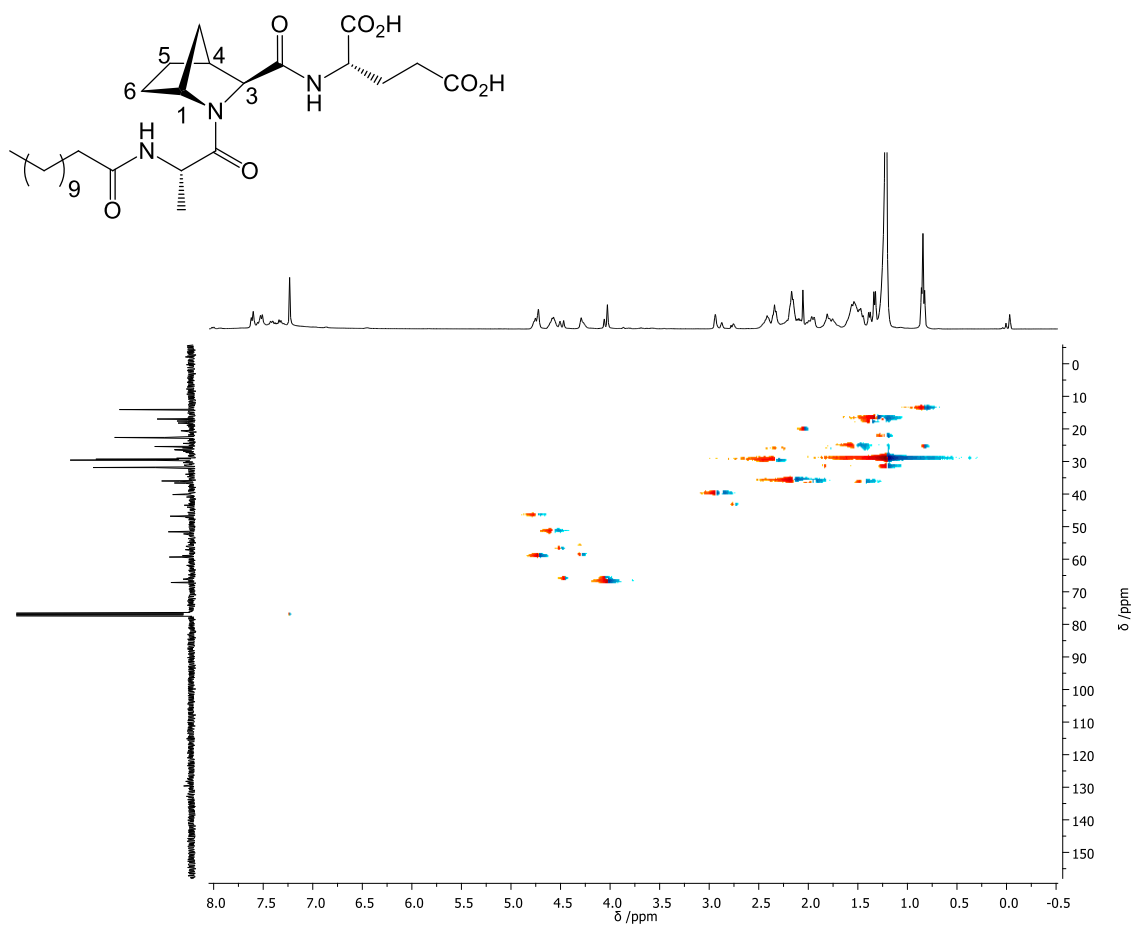
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,54 (dt, *J* = 31,5, 16,2 Hz, 2H, 2xCONH); 4,82–4,65 (m, 1H, H-3); 4,53 (dd, *J* = 36,3, 10,3 Hz, 1H, H_{Glu-2}); 4,29 (s, 1H, H-1); 4,04 (m, 1H, H_{Ala-2}); 2,84 (dd, *J* = 55,5, 17,9 Hz, 1H, H-4); 2,49–2,25 (m, 3H); 2,25 – 2,10 (m, 3H); 2,09–2,01 (m, 1H); 2,02 – 1,84 (m, 1H); 1,75 (dd, *J* = 40,3, 27,8 Hz, 2H); 1,64 – 1,39 (m, 5H); 1,40–1,26 (m, 4H); 1,21 (s, 16H, (CH₂)₈); 0,84 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [176,21 (C), 175,85 (C), 173,92 (C), 173,36 (C), 169,87 (C), COOH + CONH + CON]; 67,14 (CH, C-3); 59,33 (CH, C-1); 51,58 (CH, C_{Glu-2}); 46,79 (CH, C_{Ala-2}); 41,67 – 40,70 (CH, C-4); 17,58 (CH₃, C_{Ala-3}); 14,06 (CH₃, CH₃)

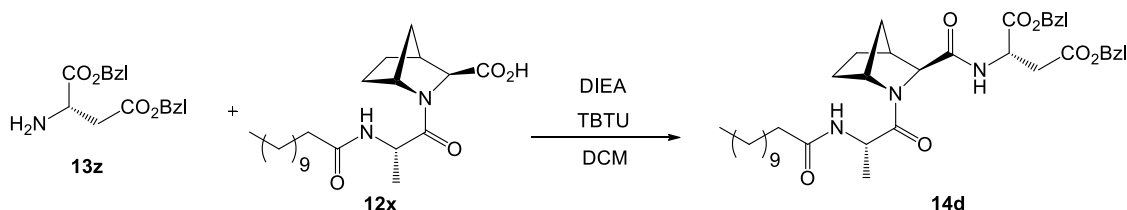
EM (ESI): *m/z* calculado para [M][−] 522,33, obtido 522,32







4.2.15 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroil-L-alanil)-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-aspartato de dibenzilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o dipéptido **12x** (0,200 g; 0,51 mmol) e o ácido L-aspartico benzil-éster de p-toluenossulfonato (**13z**) (0,371 g, 0,765 mmol, 1.5 eq.) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (0,230 g) (**14d**). O rendimento da reação foi de 65,2 %.

Composto: óleo amarelado

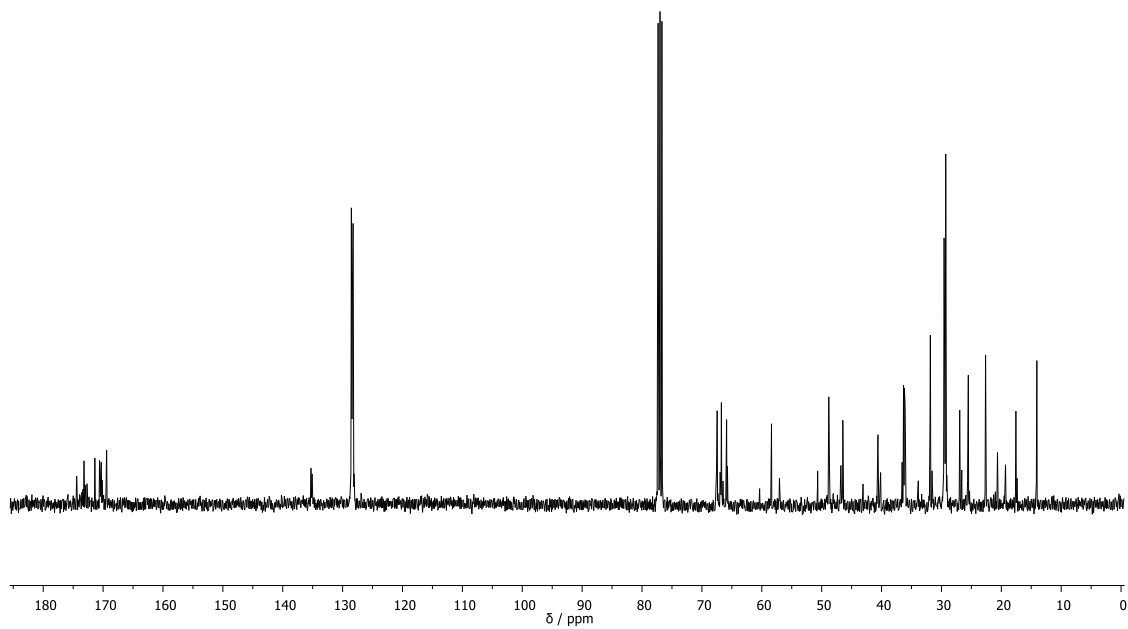
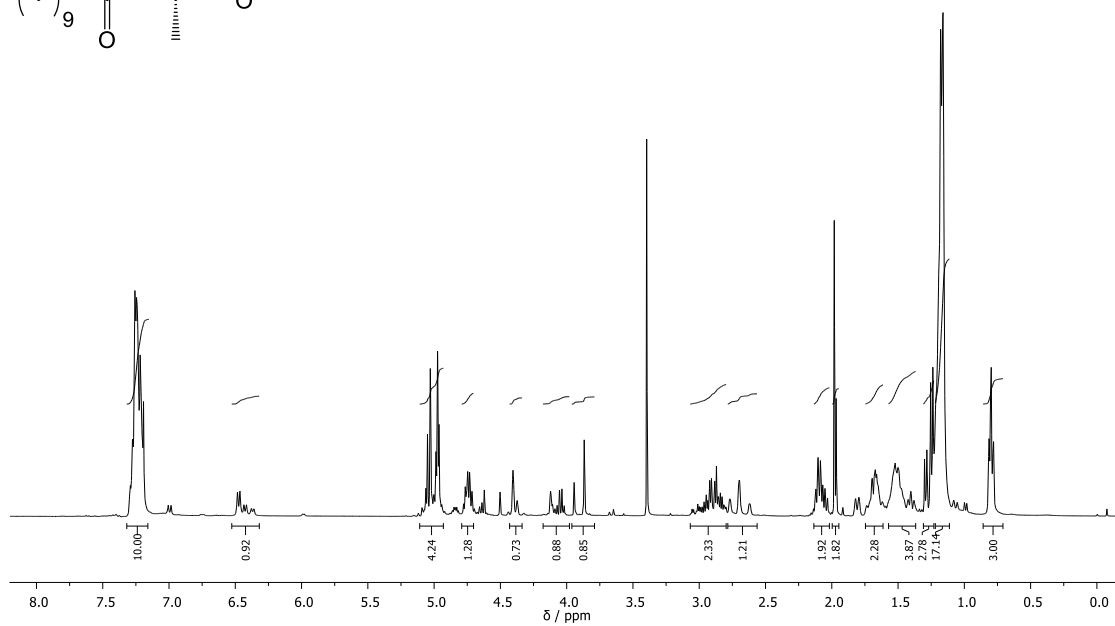
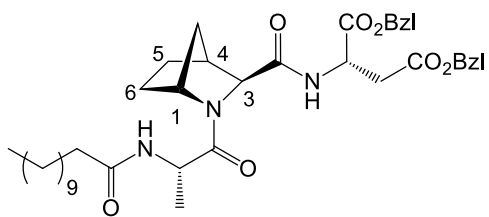
R_f: 0,61 em AcOEt

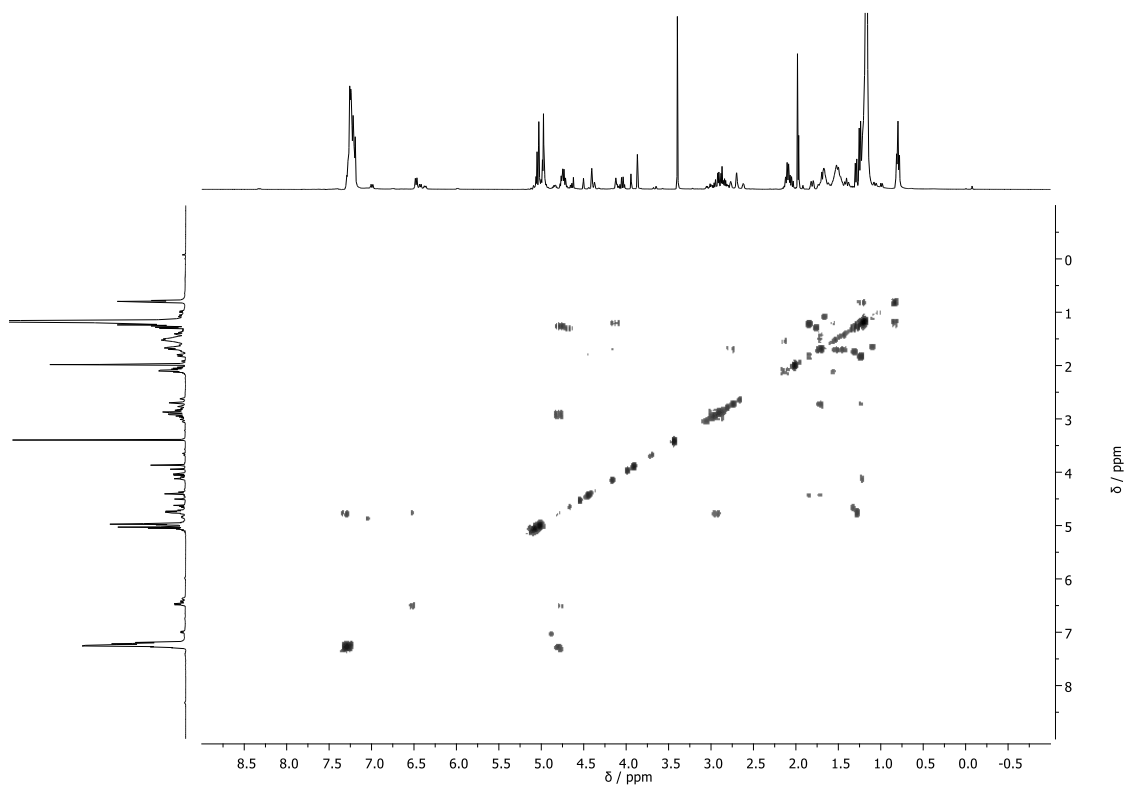
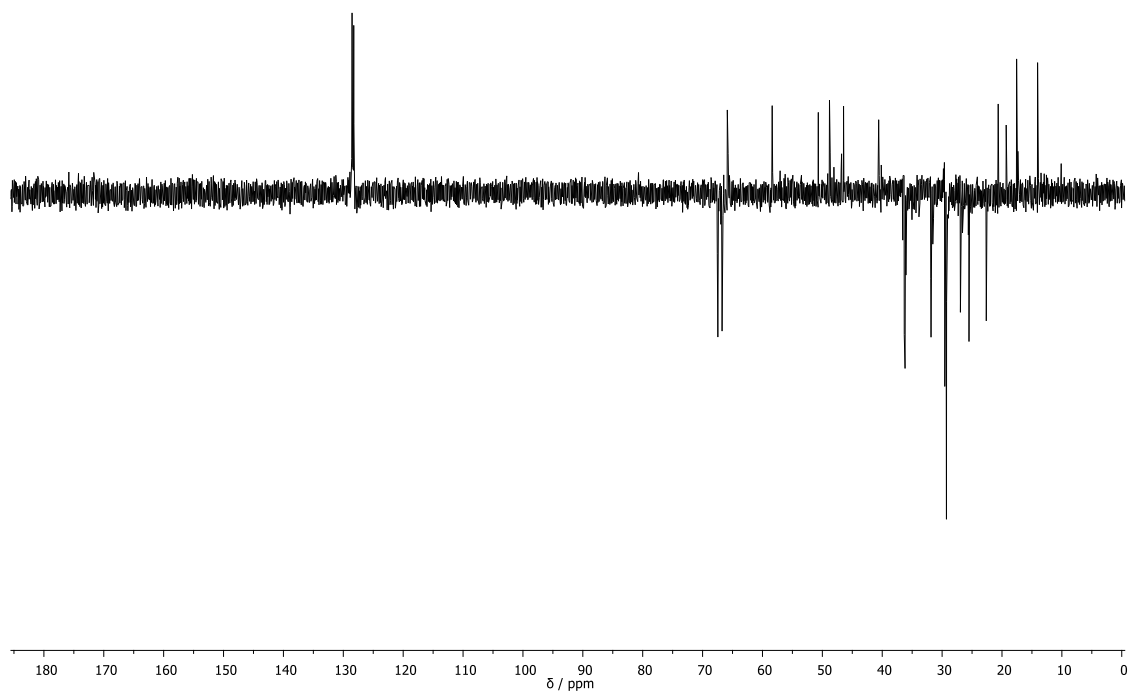
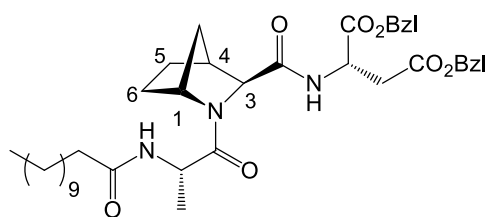
[α]_D²⁴ = − 51 (c1, MeOH)

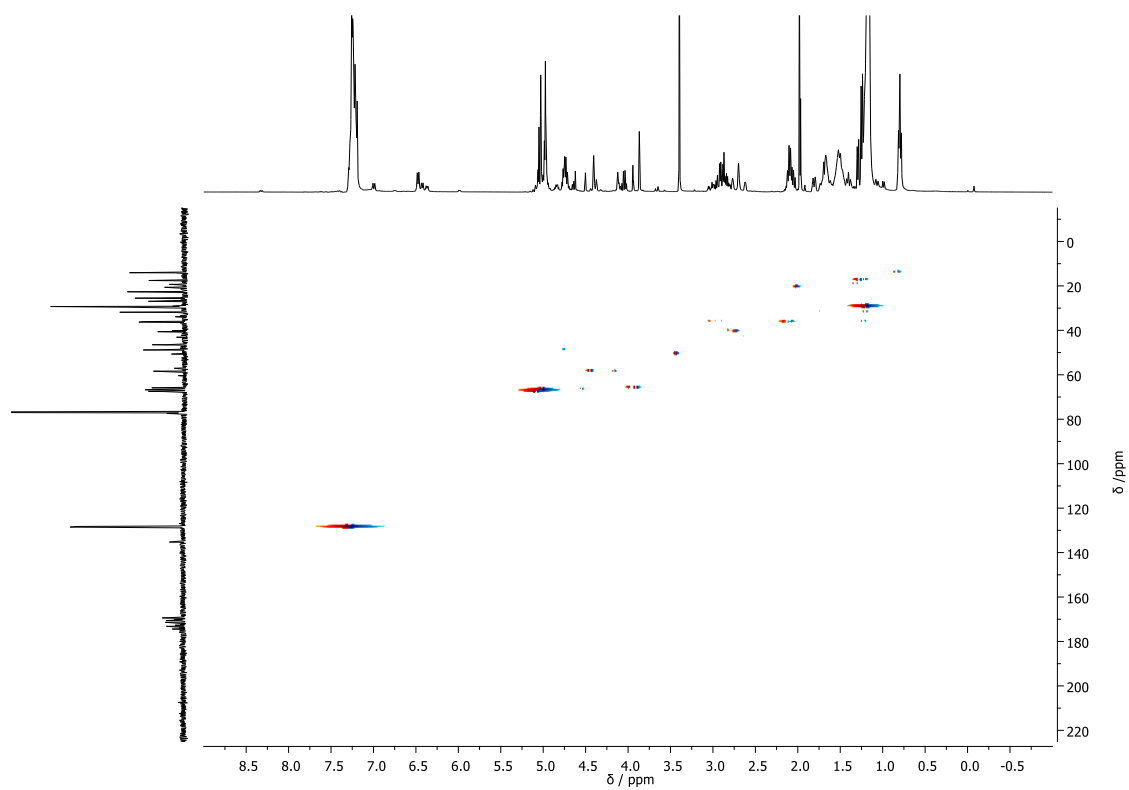
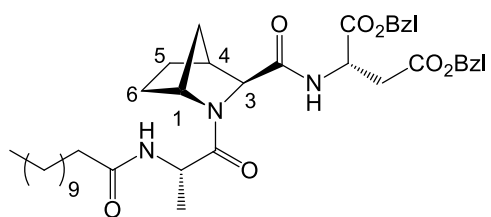
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,31–7,16 (m, 10H, 2xPh); 6,51–6,32 (m, 1H, CONH); 5,11–4,92 (m, 4H, 2xCH₂OPh); 4,79–4,69 (m, 1H, H_{Asp}-2); 4,43–4,33 (m, 1H, H-1); 4,09–3,99 (m, 1H, H_{Ala}-2); 3,96–3,81 (m, 1H, H-3); 3,04–2,77 (m, 2H); 2,77–2,56 (m, 1H, H-4); 2,14–2,02 (m, 2H); 1,97 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H); 1,74–1,60 (m, 2H); 1,57–1,35 (m, 3H, H_{Ala}-3); 1,27 (dd, *J* = 18,2, 6,8 Hz, 3H, H_{Ala}-3); 1,17 (d, *J* = 7,3 Hz, 17H, (CH₂)₈); 0,80 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, (CH₂)₈CH₃)

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: [174,41 (C), 173,19 (C), 171,37 (C), 170,51 (C), 169,41 (C), COONH + CON + COBzl]; 135,19 (Ph); 128,41 (Ph); 67,50-66,74 (CH₂, CH₂OPh); 65,81 (CH, C-3); 58,38 (CH, C-1); 48,75 (CH, C_{Asp}-2); 46,63 (CH, C_{Ala}-2); 40,60 (CH, C-4); 17,46 (CH₃, C_{Ala}-3); 14,06 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

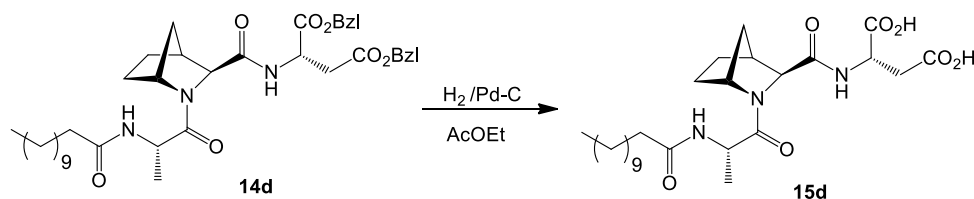
EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 690,40, obtido 690,42







4.2.16 Síntese de ácido [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*N*-lauroil-L-alanil)-2-azanorborno-3-carbonil]-L-aspártico



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **15a** (secção 4.3.6.), procedeu-se á hidrogenólise do tripéptido **14d** num ambiente saturado de H₂ durante 4 horas.

Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida originando-se um óleo amarelo (**15d**) (0,120 mg). O rendimento da reação foi de 75,8%.

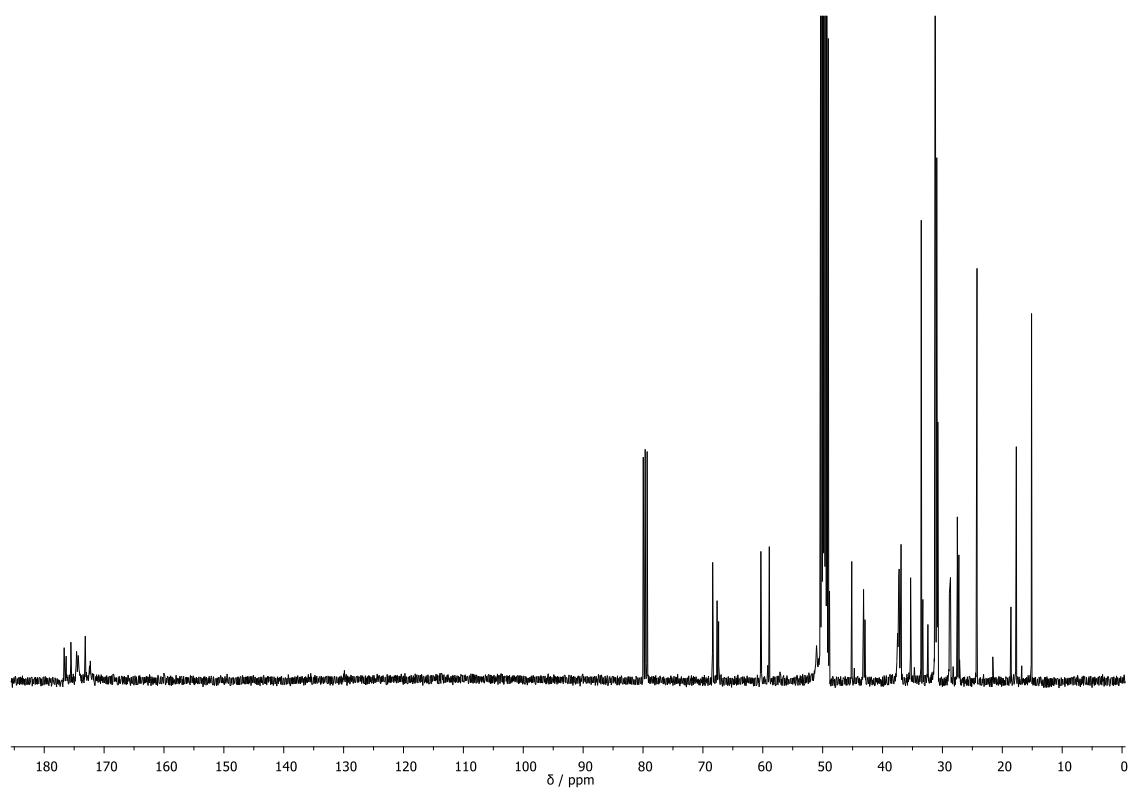
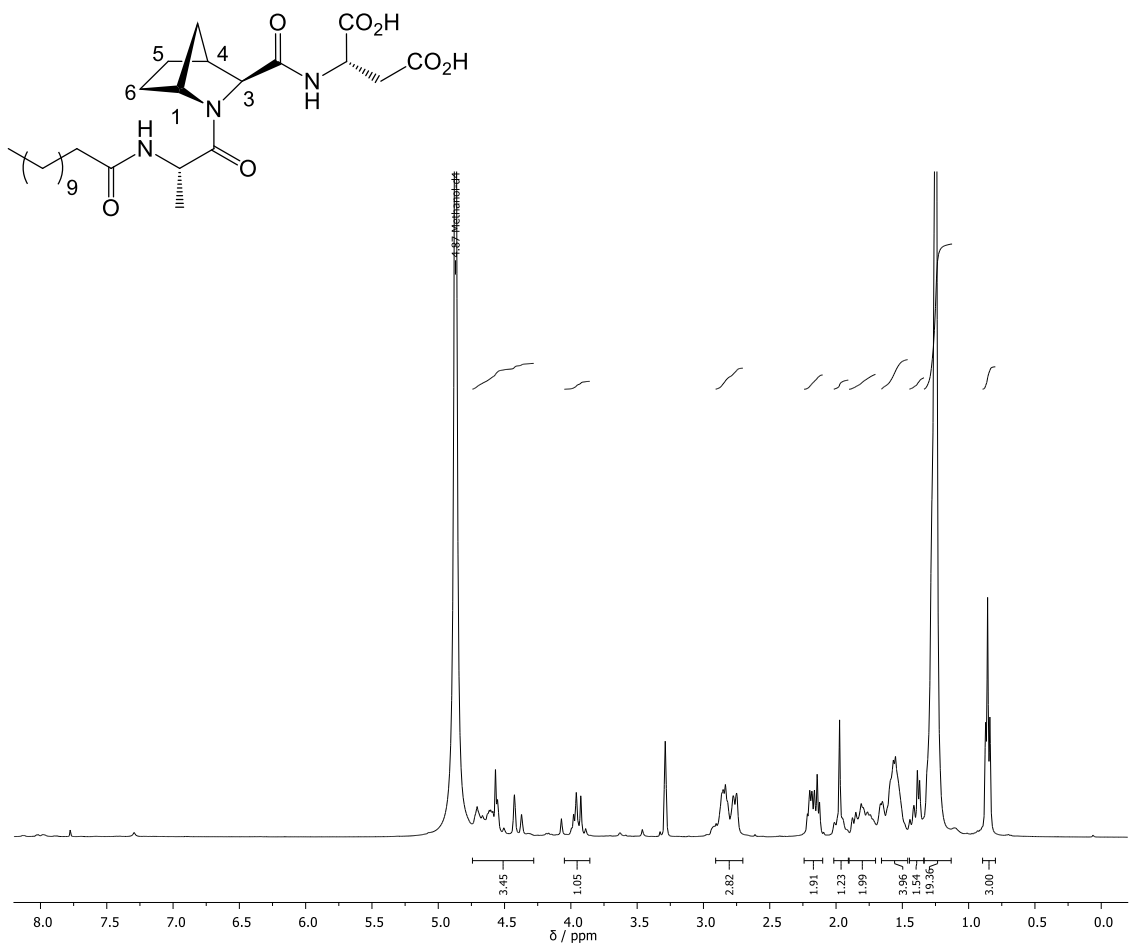
Composto: óleo amarelado

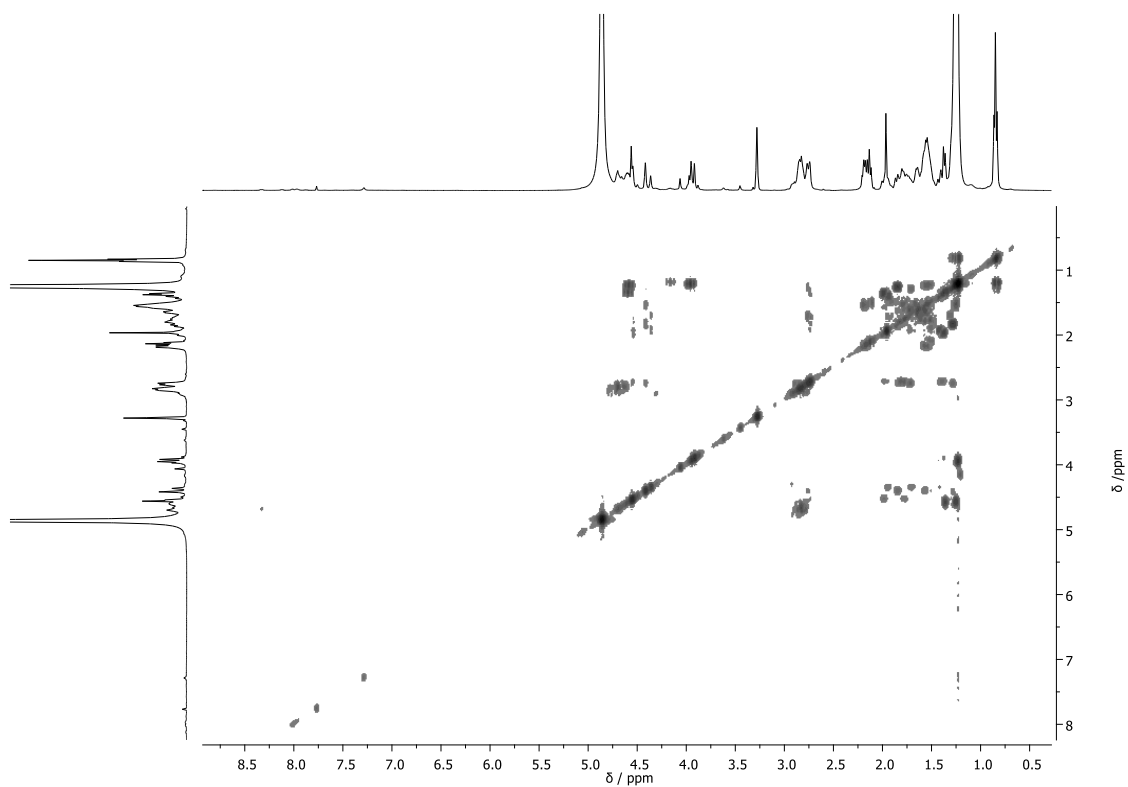
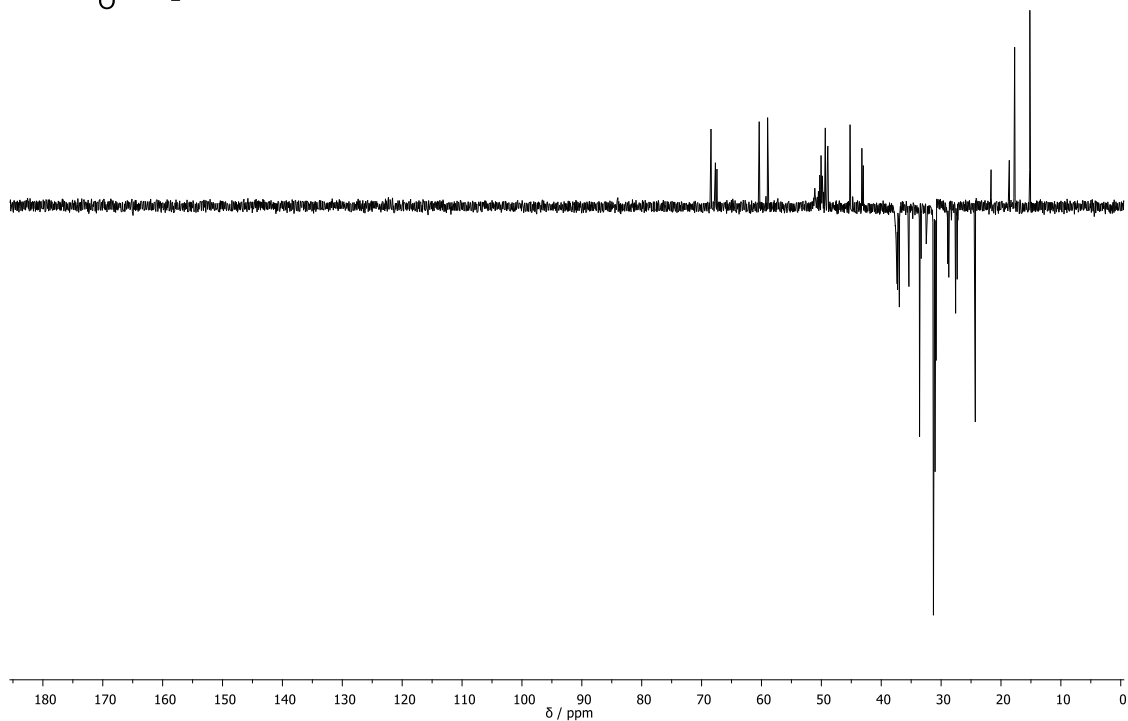
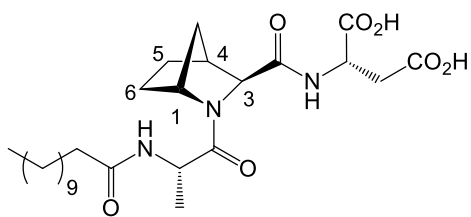
$$[\alpha]_D^{24} = -30 \text{ (} c_1, \text{MeOH)}$$

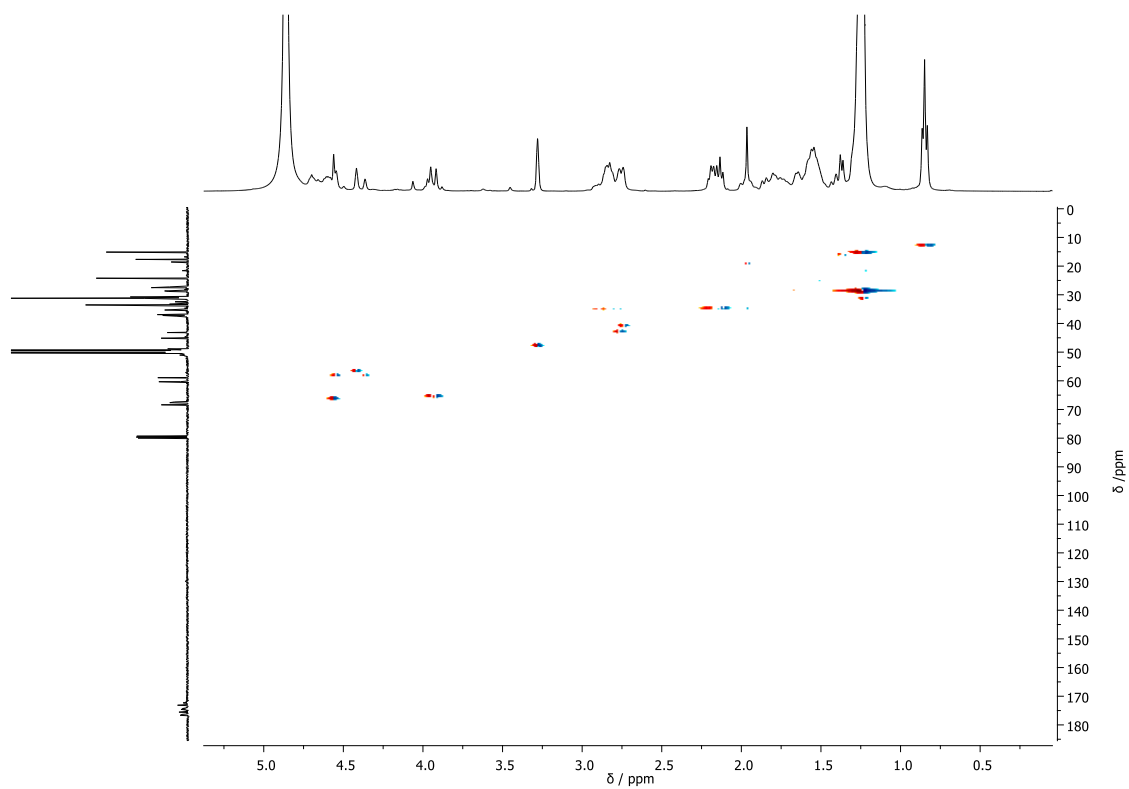
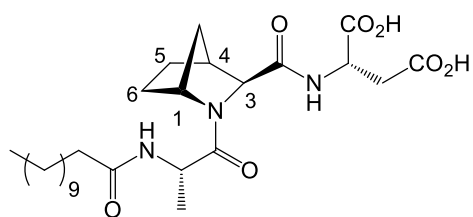
¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ: 4,60 (m, H_{Asp-2} + H-3); 4,44 – 4,32 (m, 1H, H-1); 3,99 – 3,85 (m, 1H, H_{Ala-2}); 3,29 (s, 1H); 2,94 – 2,78 (m, 2H, H_{Asp-3}); 2,76 (m, 1H, H-4); 2,26 – 2,08 (m, 2H); 2,04–1,90 (m, 1H); 1,78 (m, 2H); 1,69–1,46 (m, 3H); 1,45–1,33 (m, 1H); 1,25 (s, 16H, (CH₂)₈CH₃); 0,86 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H, (CH₂)₈CH₃)

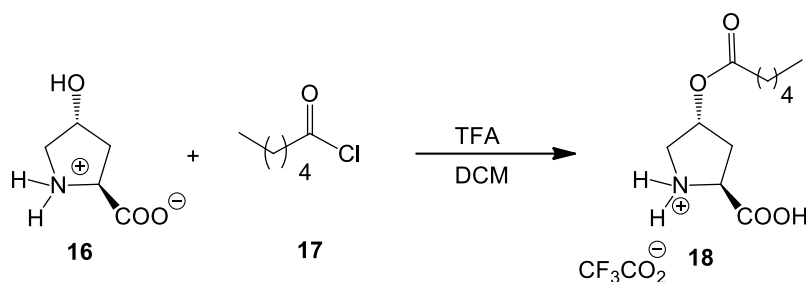
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, MeOD) δ: [176,50 (C), 175,55 (C), 174,59 (C), 173,14 (C), 172,30 (C), COOH + CONH + CON]; 68,43 (CH, C-3); 60,38 (CH, C-1); 58,97 (CH, C_{Asp-2}); 45,20 (CH, C_{Ala-2}); 43,11 (CH, C-4); 17,72 (CH₃, C_{Ala-3}); 15,18 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁻ 508,31, obtido [M]⁻ 508,30







4.2.17 Síntese de hexanoato de (4*R*)-4-hidroxirolina

De acordo com o procedimento descrito pela bibliografia ⁷², para um balão dissolveu-se a hidroxiprolina (**16**) (2,00 g; 11,9 mmol) em TFA (15 mL) num ambiente inerte. Colocou-se a mistura reacional em banho de gele e passado 15 minutos adicionou-se o cloreto de hexanoilo (**17**) (3,31 mL; 3,19 g; 23,8 mmol; 2eq). Deixou-se a reação em agitação magnética continua num ambiente inerte durante 16h. Controlou-se a reação por CCF.

No final da reação eliminou-se o TFA em excesso por pressão reduzida e de seguida precipitou-se o composto adicionando-se Et₂O obtendo-se um solido branco (**18**). O rendimento da reação foi de 66,0%.

Composto: sólido branco

$[\alpha]_D^{24} = -16$ (c1, MeOH)

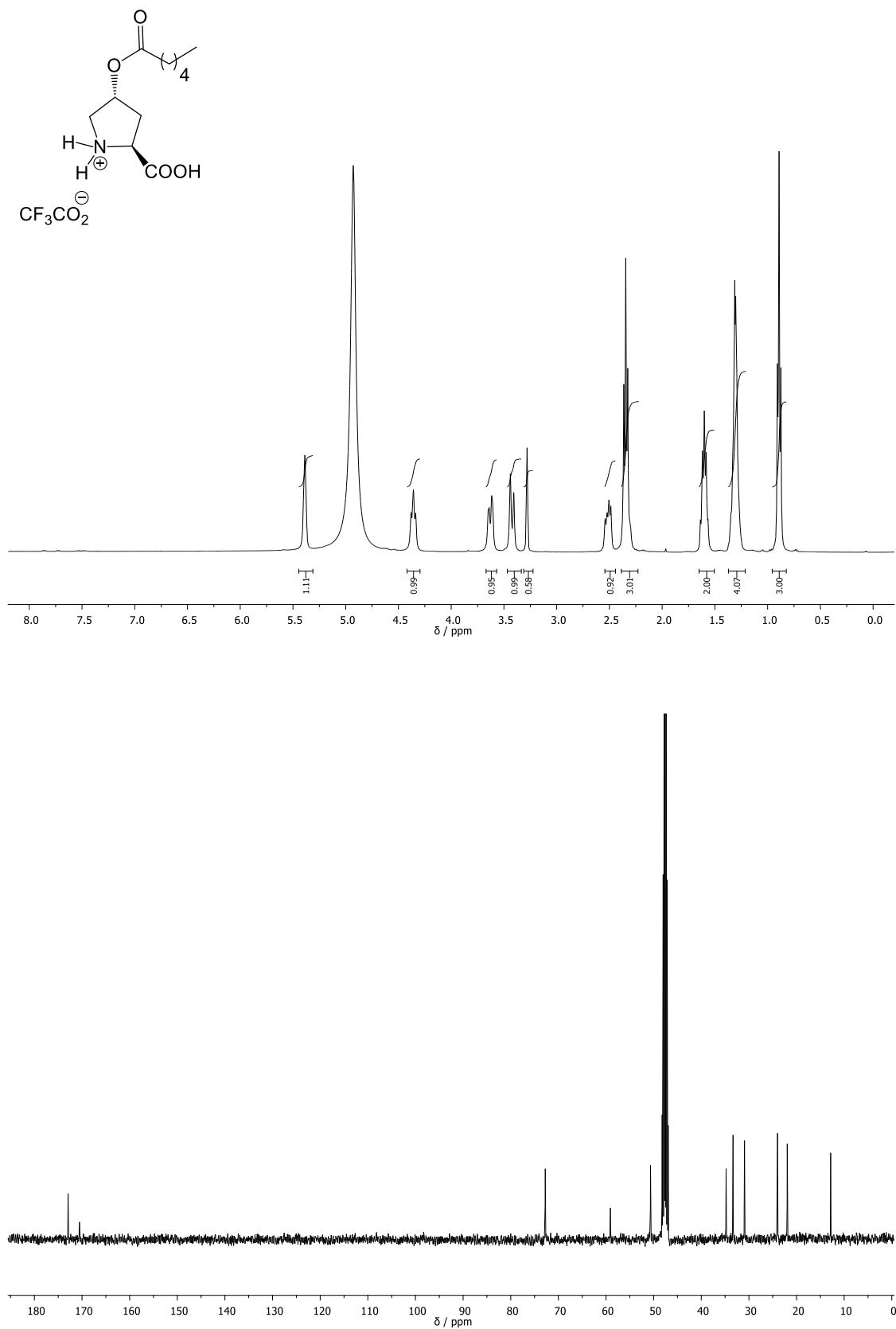
R_f: 0,56 em AcOEt

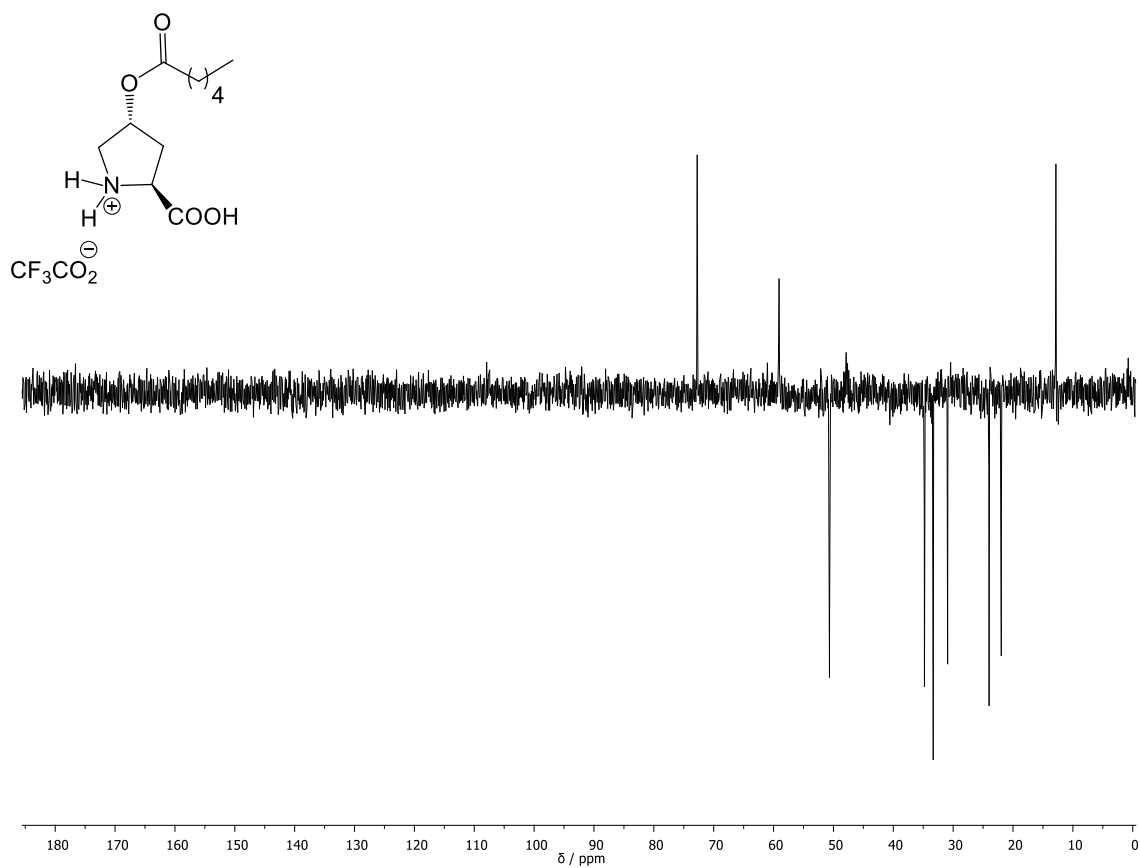
P.f.: 92 - 98 °C

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ: 5,39 (s, 1H, NH); 4,36 (t, *J* = 8,6 Hz, 1H, H-2); [3,63 (dd, *J* = 12,7, 3,3 Hz, 1H); 3,42 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H); 3,28 (s, 1H); H-4 + H-5], 2,54 – 2,41 (m, 1H, H-3); 2,34 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, COCH₂CH₂); 1,66 – 1,50 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃); 1,39 – 1,20 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃); 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, (CH₂)₄CH₃)

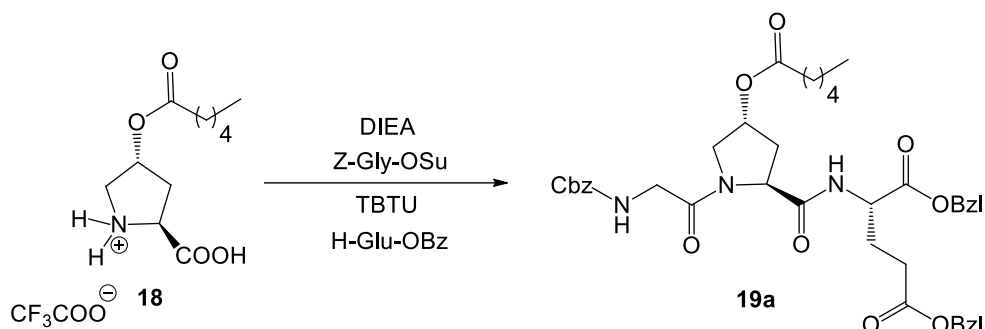
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, MeOD) δ: [172,92 (C), 170,53 (C), COO⁻ + COO]; 72,76 (CH, C-4); 59,08 (CH, C-2); 50,66 (CH₂, C-5); 34,79 (CH₂, C-3); 12,84 (CH₃, (CH₂)₄CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 230,13 obtido 230,14





4.2.18 Síntese de Z-glicil-[(4R)-4-hexanoiloxiprolil]-L-glutamato de dibenzilo



Adicionou-se o aminoácido **18** (0,500 g; 2,01 mmol) num balão de fundo redondo e dissolveu-se em DCM anidro num ambiente inerte. Posteriormente adicionou-se DIEA (0,720 mL, 4,12 mmol, 2 eq.) e a glicina ativada (**Z-Gly-OSu**) (0,659 g; 2,01 mmol; 1eq) e só passado 30 minutos de agitação magnética é que se adicionou o agente de acoplamento TBTU (0,727g, 2,21 mmol, 1.1 eq.). Por fim passado 1 hora de agitação magnética adicionou-se o ácido glutâmico protegido (**H-Glu-OBz**) (0,898 g, 2,47 mmol, 1.2 eq.). Deixou-se a mistura reacional em agitação magnética contante á temperatura ambiente e num ambiente inerte durante 5 horas sendo controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com HCl 1M e a fase aquosa com AcOEt. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**19a**) (0,930 g). O rendimento da reação foi de 60,0%.

Composto: óleo transparente

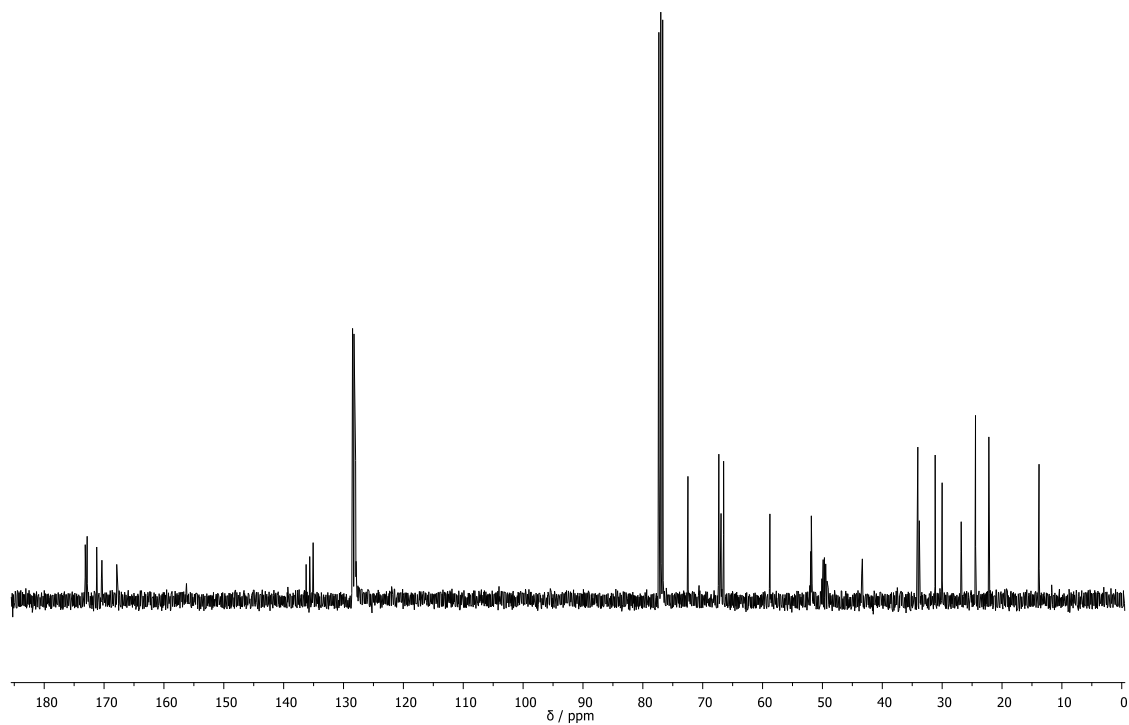
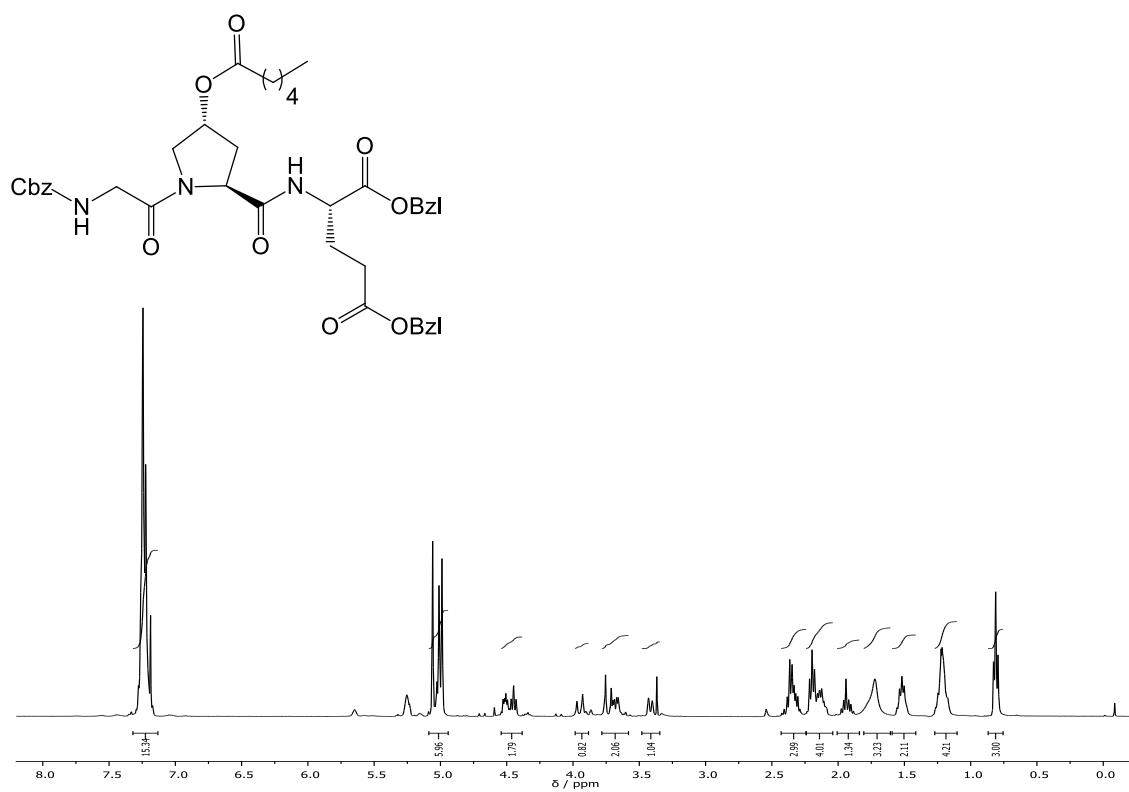
Rf: 0,83 em AcOEt

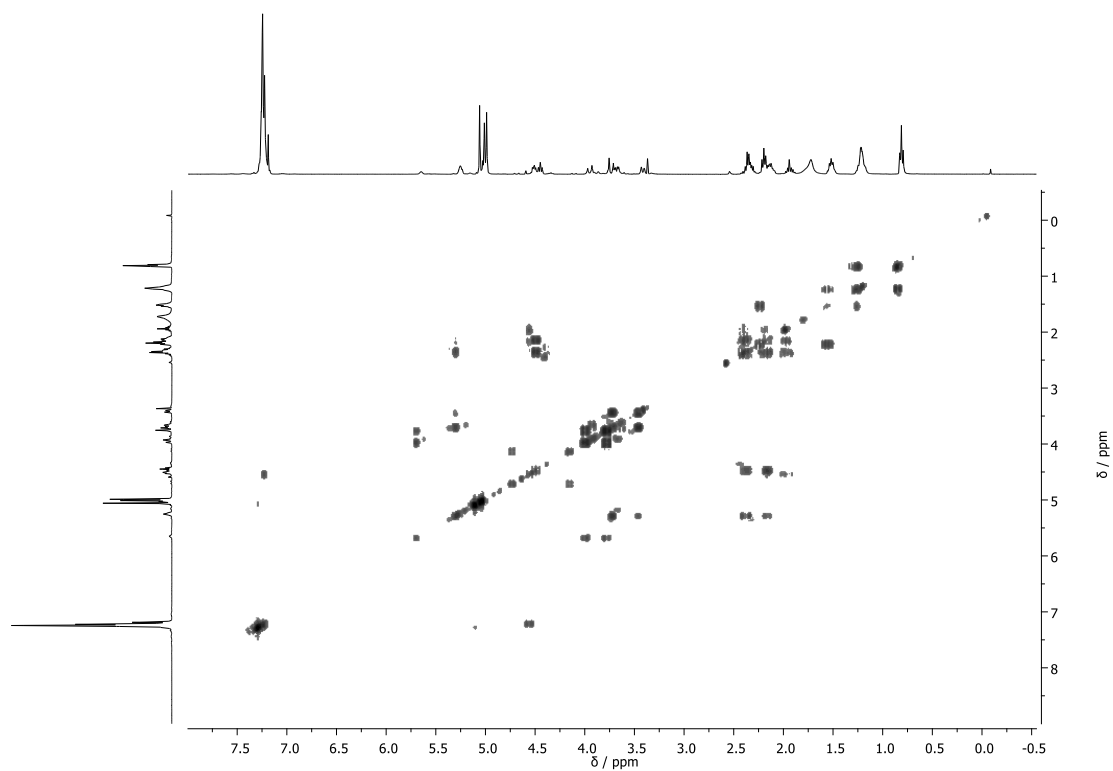
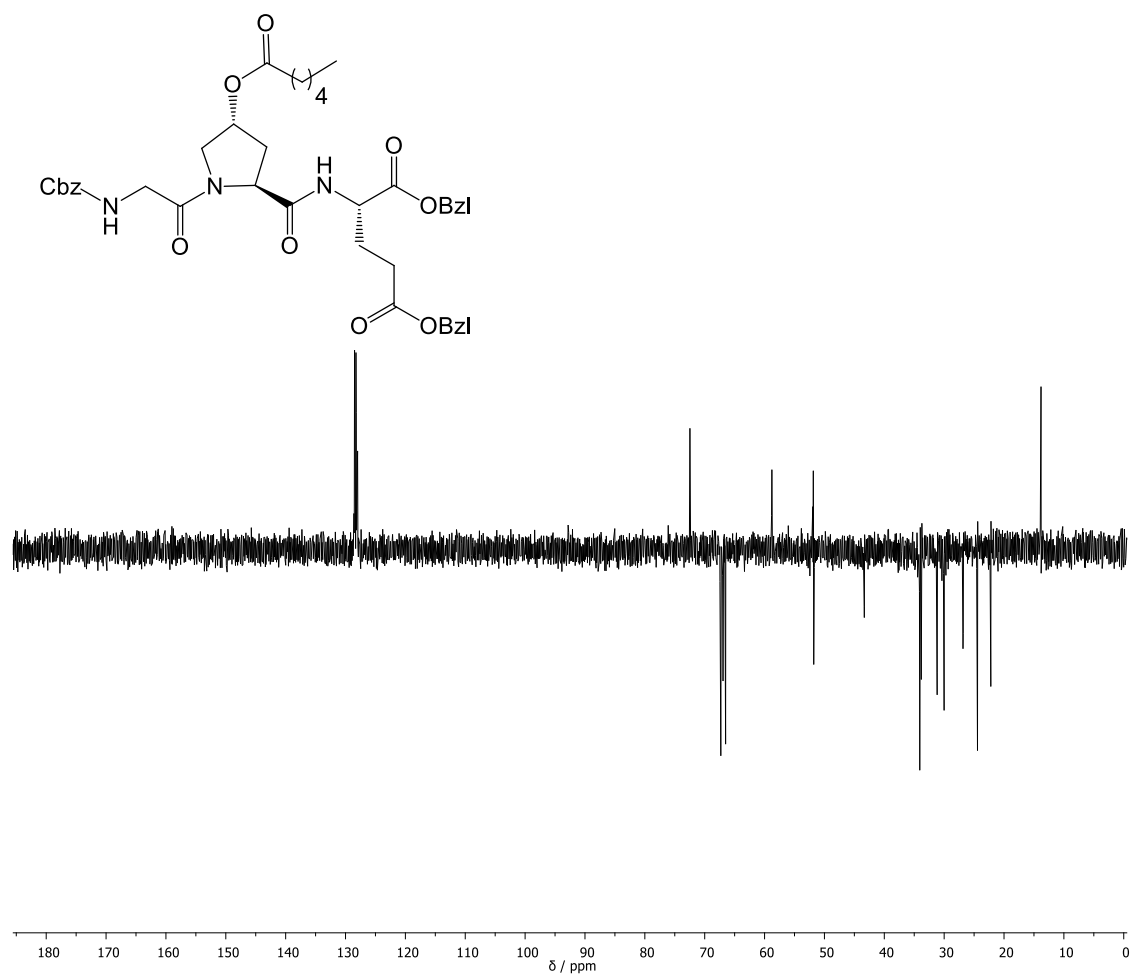
$[\alpha]_D^{24} = -30$ (c1, MeOH)

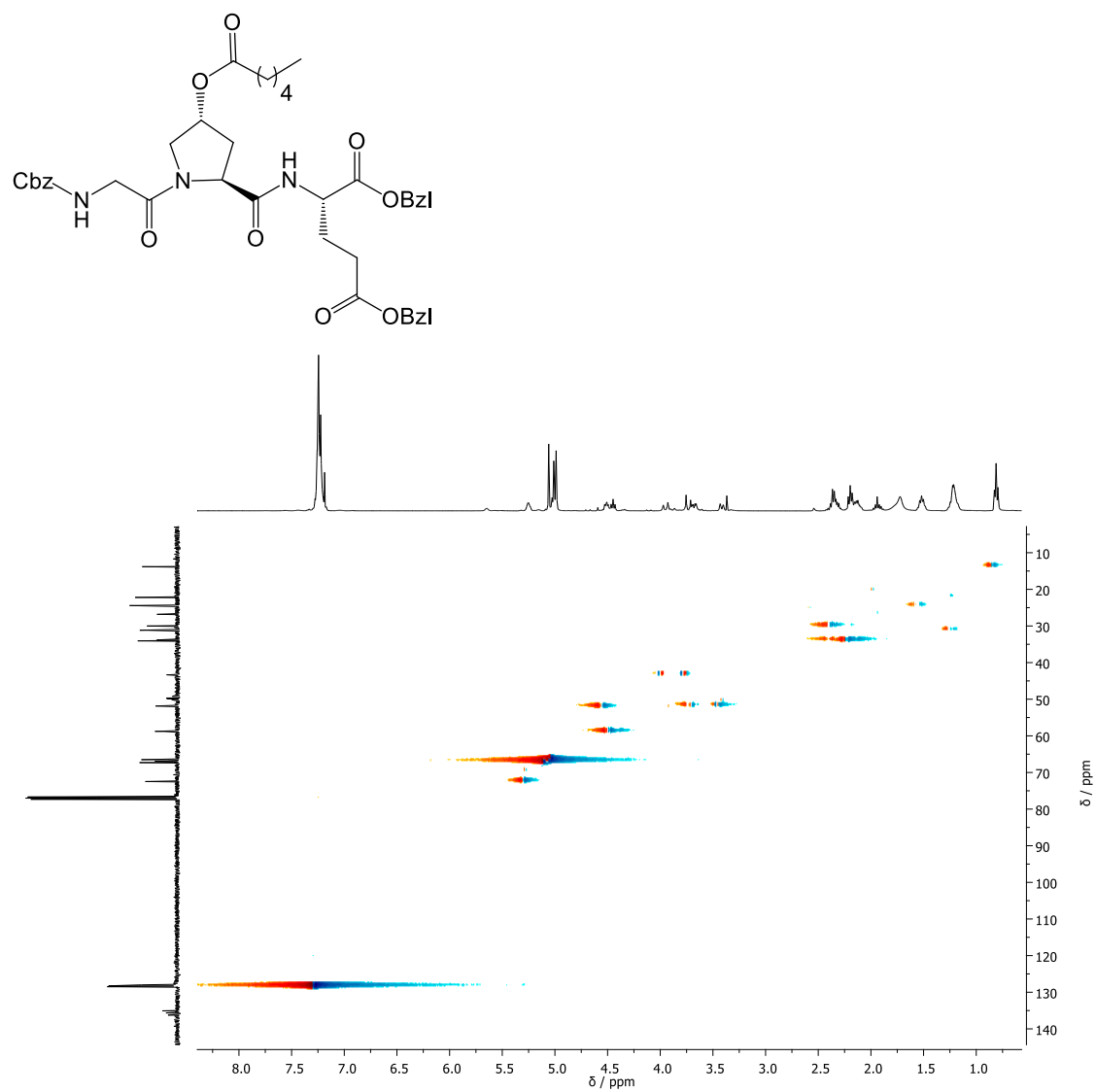
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,32–7,15 (m, 15H, 3xPh); 5,30–5,19 (m, 1H, H-4); 5,09–4,92 (m, 6H, 3xCH₂Ph); 4,55–4,38 (m, 2H, H-1 + H_{Glu}-2); 3,92 (dd, *J* = 26,4, 16,4 Hz, 1H, H_{Gly}-2); 3,76–3,58 (m, 2H, H_{Gly}-2 + H-5); 3,48–3,32 (m, 1H, H-3); 2,42–2,24 (m, 3H); 2,24–2,03 (m, 4H); 1,99–1,86 (m, 1H); 1,72 (s, 3H); 1,53 (dd, *J* = 14,5, 7,3 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃); 1,27–1,12 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃); 0,81 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, (CH₂)₄CH₃)

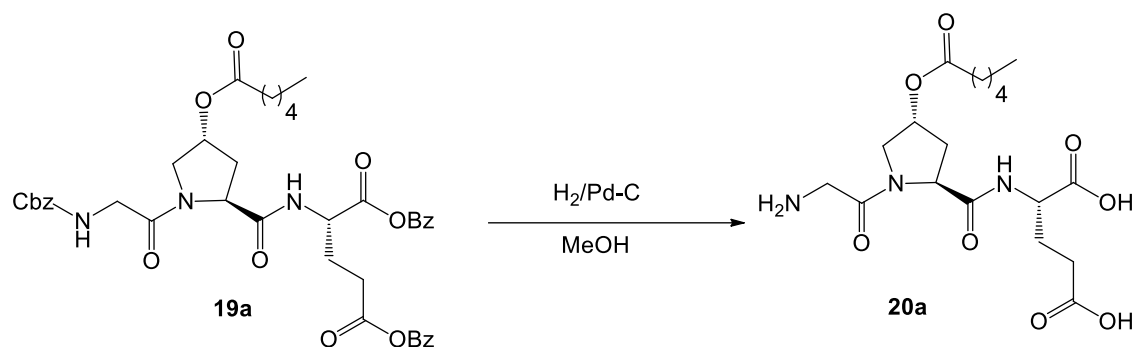
^{13}C -RMN e DEPT (100 MHz, CDCl_3) δ : [173,15 (C), 172,82 (C), 171,23 (C), 170,36 (C), 167,89 (C), COOBzl + COO + CONH + CON]; 128,27 (CH, Ph); 72,47 (CH, C-4); 67,93 – 65,24 (CH_2 , CH_2Ph); 58,78 (CH, C-2); 51,86 (CH, $\text{C}_{\text{Glu-2}}$); 51,79 (CH_2 , C-5); 43,34 (CH_2 , $\text{C}_{\text{Gly-2}}$); 13,82 (CH_3 , $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$)

EM (ESI): m/z calculado para $[\text{M}]^+$ 758,28 obtido 758,30







4.2.19 Síntese de ácido glicil-[(4*R*)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-glutâmico

Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **15a** (seção 4.3.6.), procedeu-se à hidrogenólise do tripéptido **19a** (0,200 g, 0,264 mmol) num ambiente saturado de H_2 durante 4 horas.

Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida e recristilizou-se usando éter etílico obtendo-se um sólido branco (**20a**) (0,050 g). O rendimento da reação foi de 45,0%.

Composto: Sólido Branco

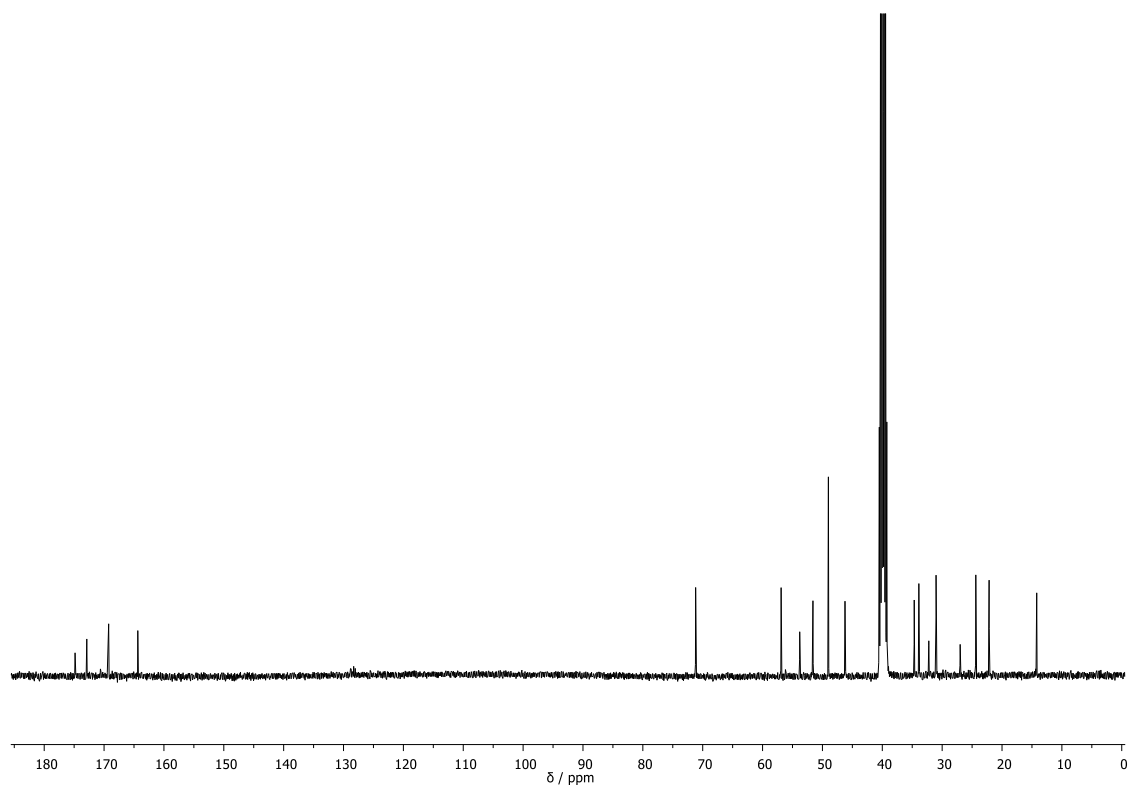
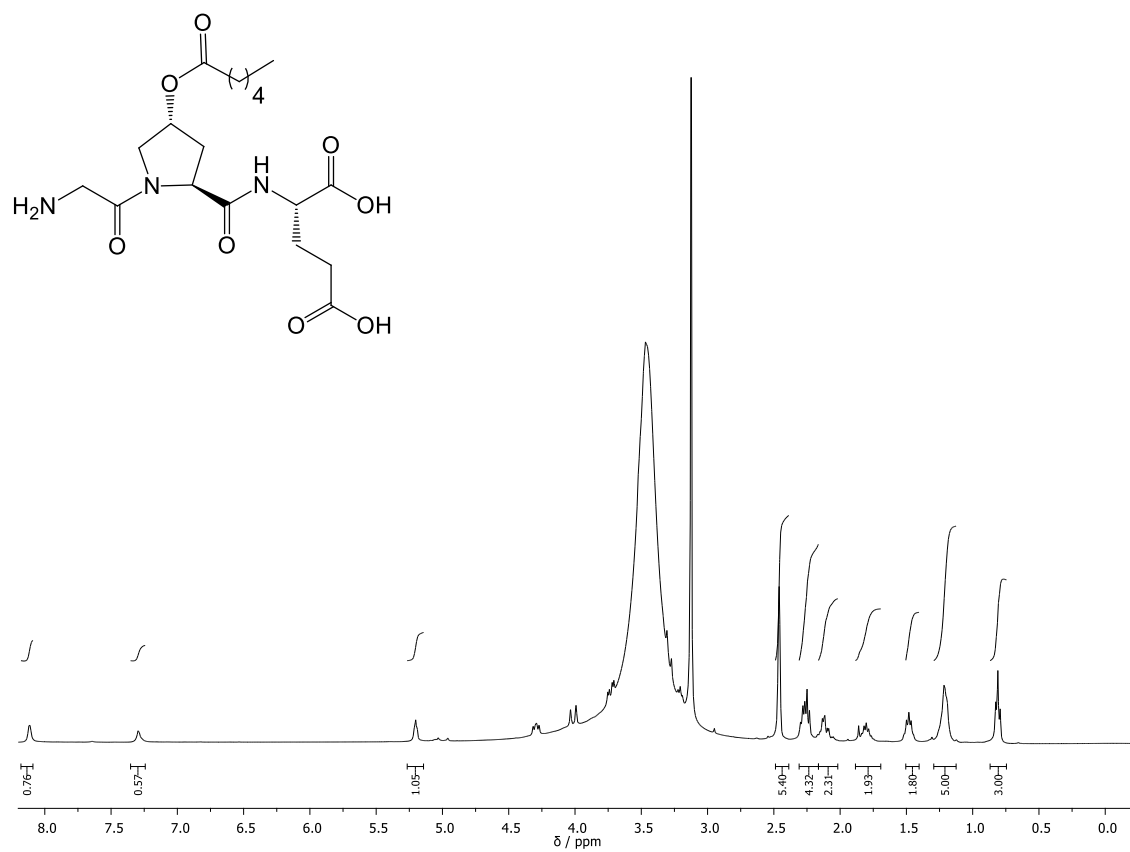
P.f.: 59,6 – 61,2 °C

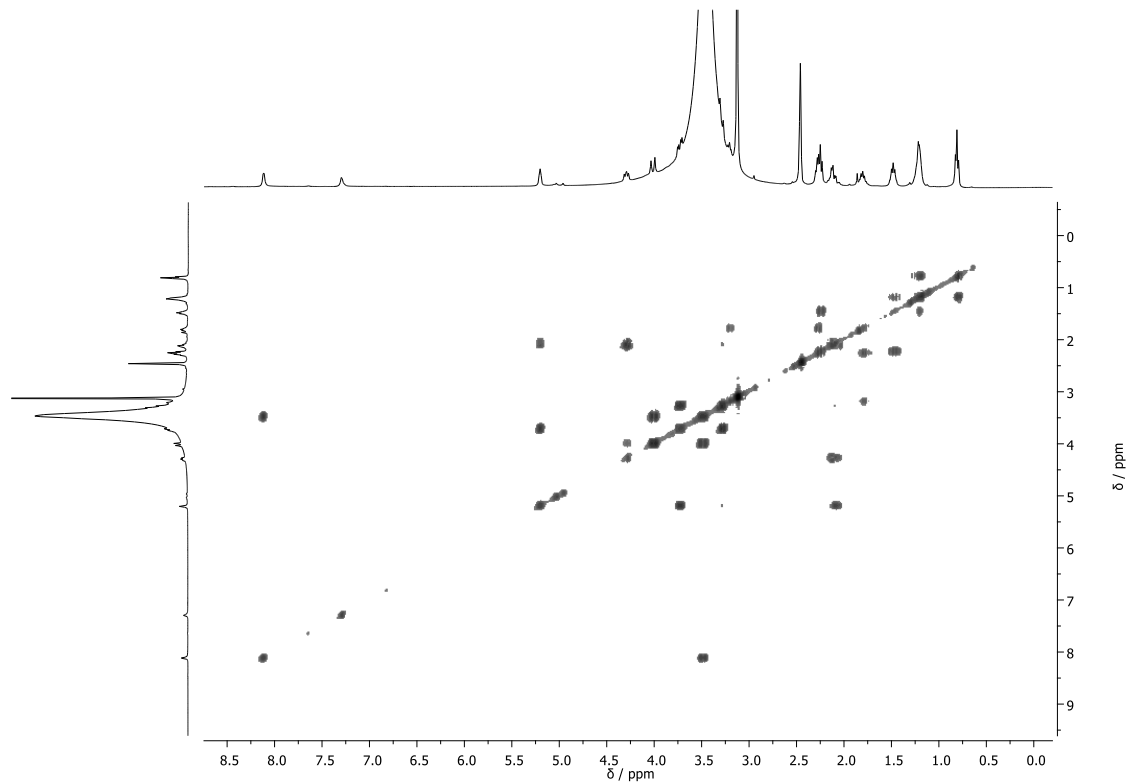
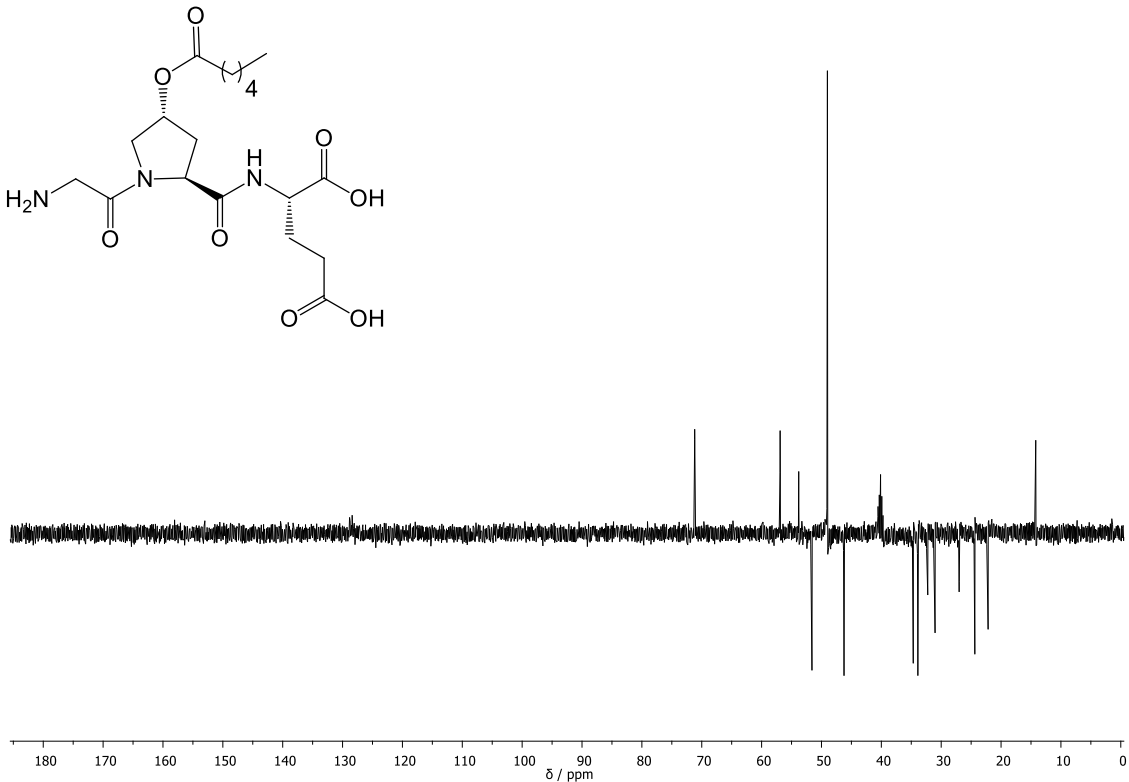
$[\alpha]_D^{24} = -25$ (c1, MeOH)

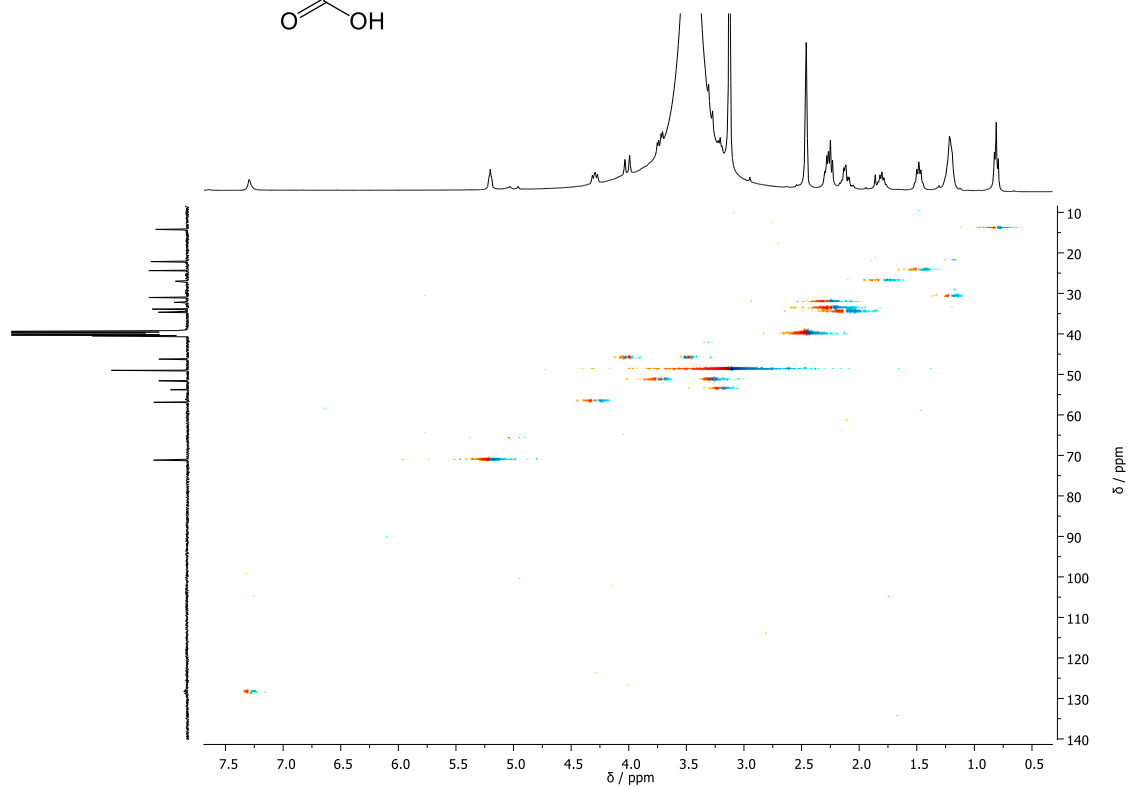
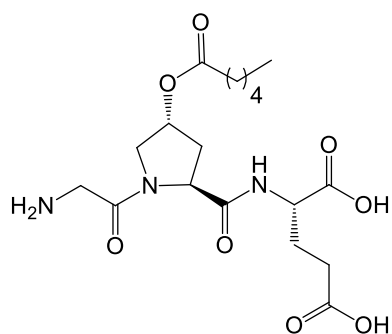
1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5,20 (s, 1H, H-4); 4,27 (m, 3H, H-2 + H_{Glu}-2); 4,01 (m, 3H, H_{Gly}-2 + H-5); 2,46 (s, 6H); 2,33–2,17 (m, 5H); 2,19–1,96 (m, 3H); 1,91–1,67 (m, 2H); 1,56 – 1,40 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$); 1,19 (dt, $J = 30,0, 15,2$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_3$); 0,89 – 0,72 (t, $J = 6,7$ Hz 3H, $(CH_2)_4CH_3$)

^{13}C -RMN e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ : [174,84 (C), 172,89 (C), 169,23 (C), 164,36 (C), CONH + CON + COOH + COO]; 71,18 (CH, C-4); 56,90 (CH, C-2); 53,80 (CH, C_{Glu}-2); 51,59 (CH₂, C-5); 46,23 (CH₂, C_{Gly}-2); 14,21 (CH₃, $(CH_2)_4CH_3$)

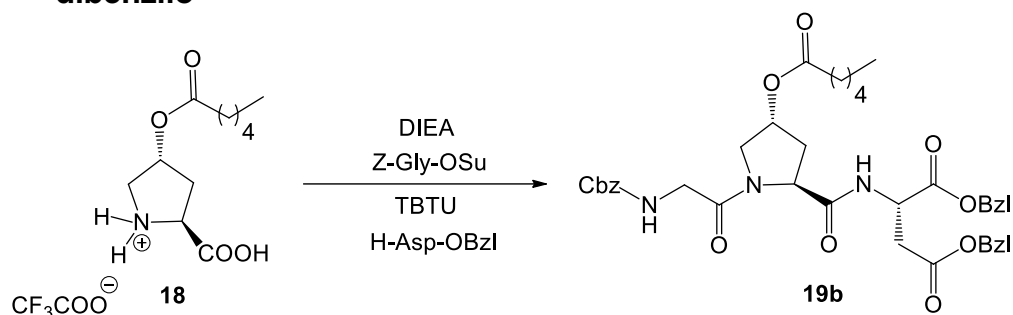
EM (ESI): m/z calculado para $[M]^-$ 414,20, obtido 414,19







4.2.20 Síntese de Z-glicil-[(4R)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-aspartato de dibenzilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **19a** (secção 4.3.18.), procedeu-se ao acoplamento duplo entre o aminoácido **18** (0,500 g; 2,06 mmol), a glicina ativada (**Z-Gly-OSu**) (0,630 g; 2,06 mmol; 1eq) e o ácido aspártico protegido (**H-Asp-OBzl**) (1,200 g, 2,47 mmol, 1.2 eq) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com HCl 1M e a fase aquosa com AcOEt. Secou-se a fase orgânica obtida com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**19b**) (0,955 g). O rendimento da reação foi de 65,2 %.

Composto: óleo transparente

Rf: 0,78 em AcOEt

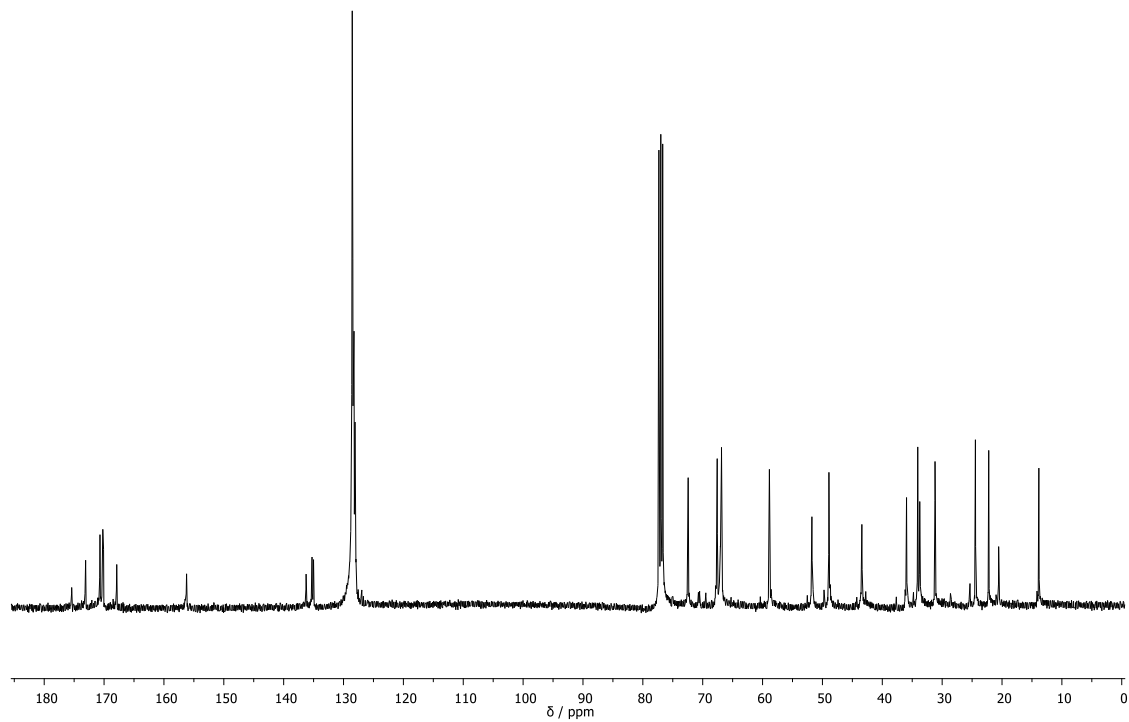
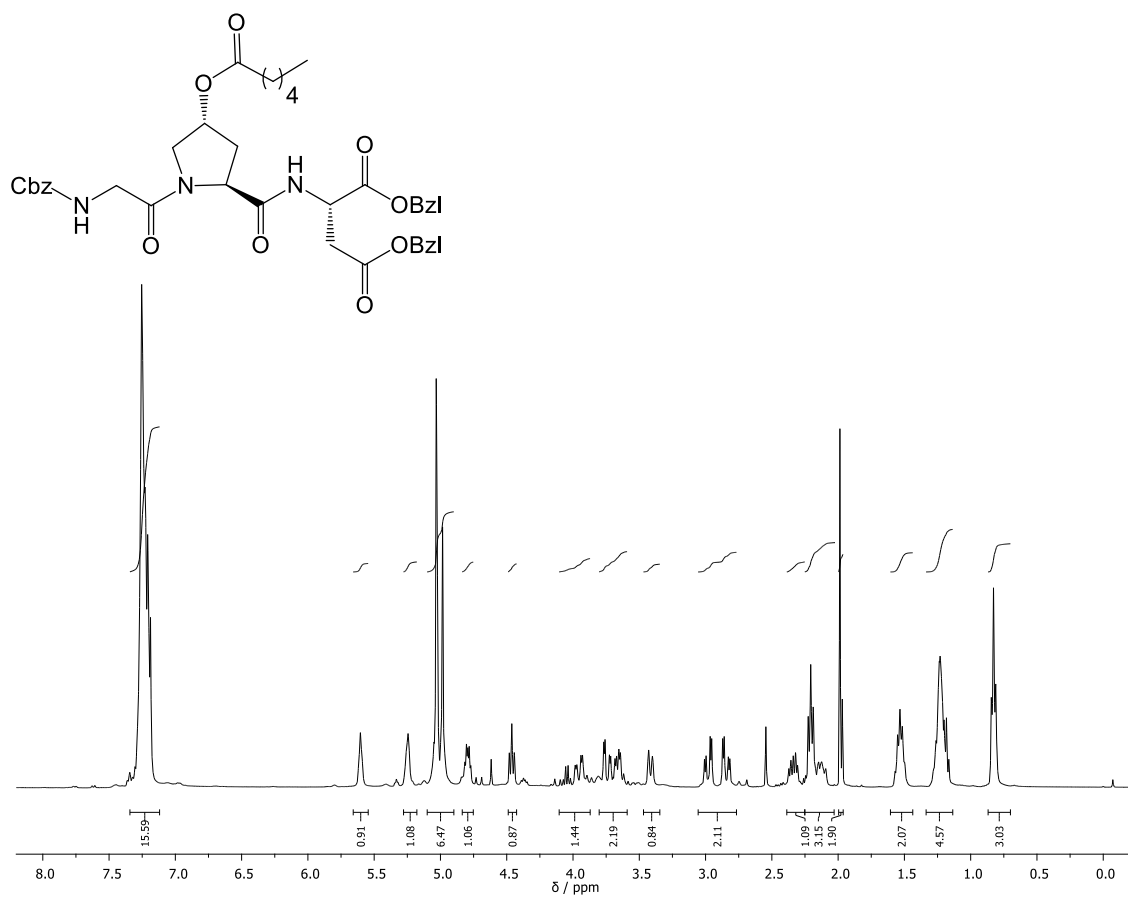
$[\alpha]_D^{24} = -27$ (c_1 , MeOH)

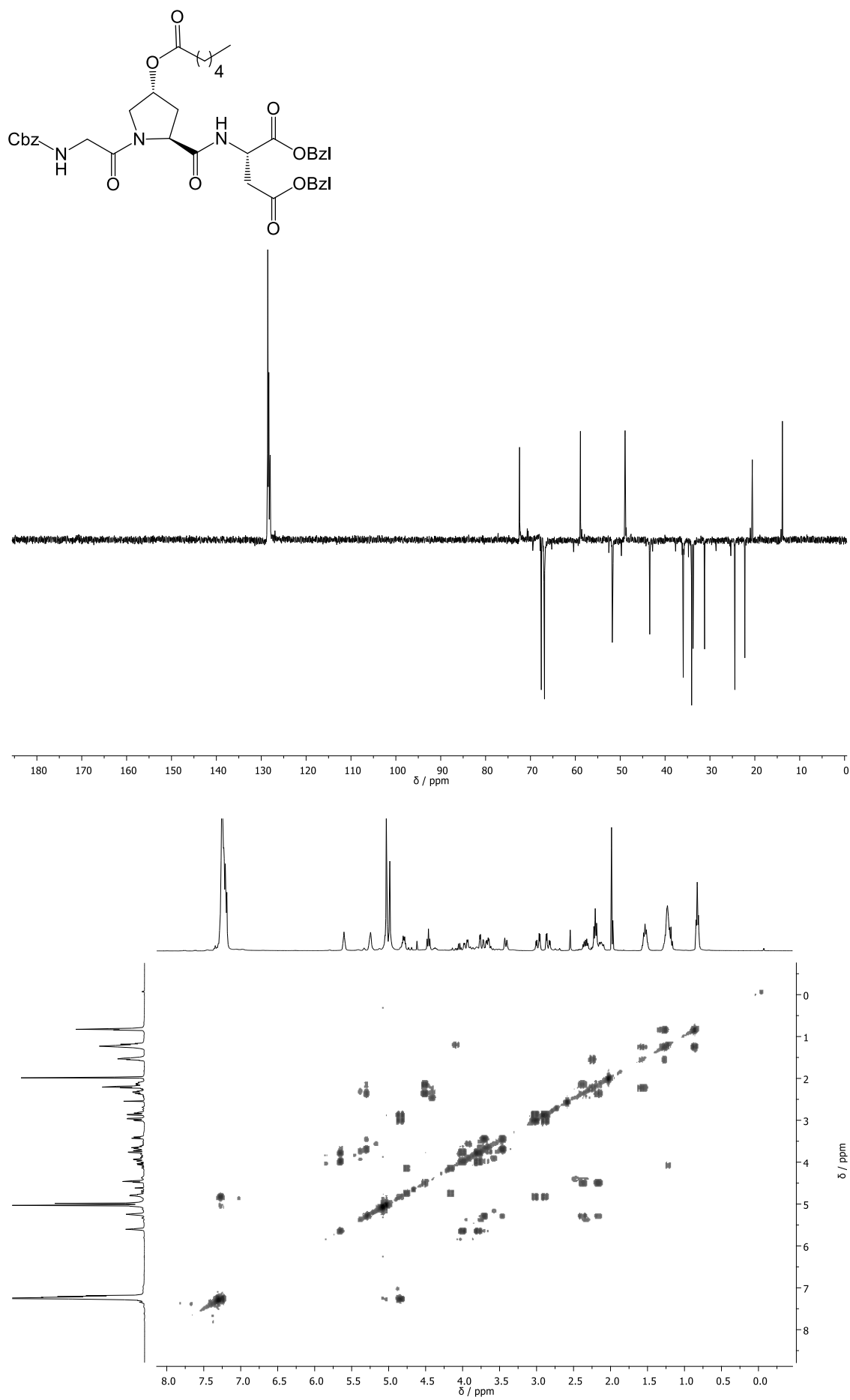
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,34–7,12 (m, 15H, 3xPh); 5,60 (s, 1H, CONH); 5,24 (s, 1H, H-4); 5,02 (m, 6H, 3x CH_2Ph); 4,74 (dt, $J = 25,2, 10,5$ Hz, 1H, H-5); 4,46 (m, 1H, H-2); 4,10–3,87 (m, 1H, $\text{H}_{\text{Gly-2}}$); 3,80–3,59 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Gly-2}} + \text{H}_{\text{Asp-2}}$); 3,42 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H); 3,06–2,77 (m, 2H); 2,39 – 2,25 (m, 1H); 2,25–2,03 (m, 3H); 1,98 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H); 1,61–1,44 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,34–1,14 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 0,83 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$)

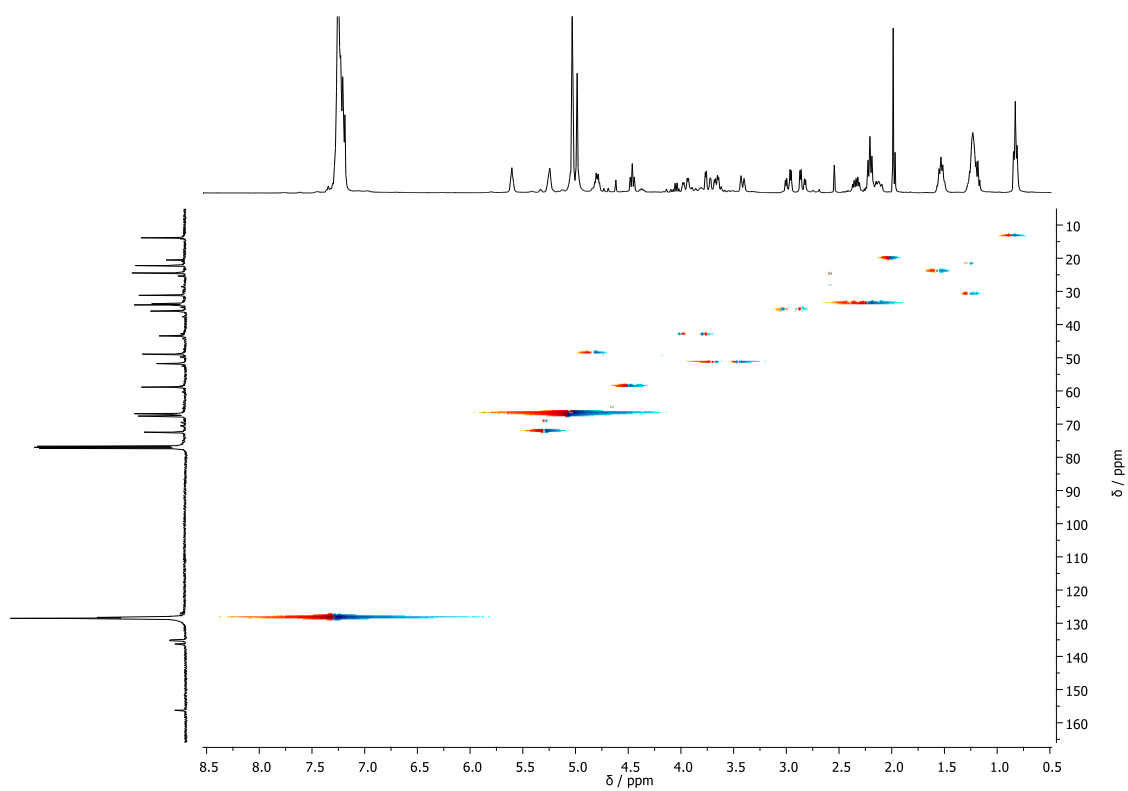
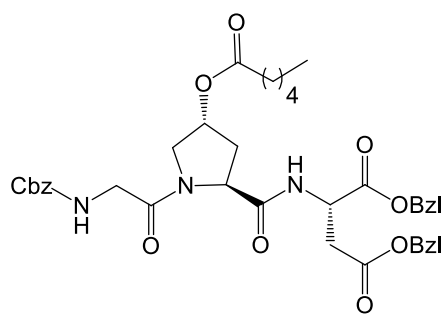
^{13}C -RMN e DEPT (100 MHz, CDCl_3) δ : [173,08 (C), 170,68 (C), 170,21 (C), 170,08 (C), 167,88 (C), COOBz+ CONH + COO]; 129,66–126,71 (CH, Ph); 72,43 (CH, C-4); 67,87–

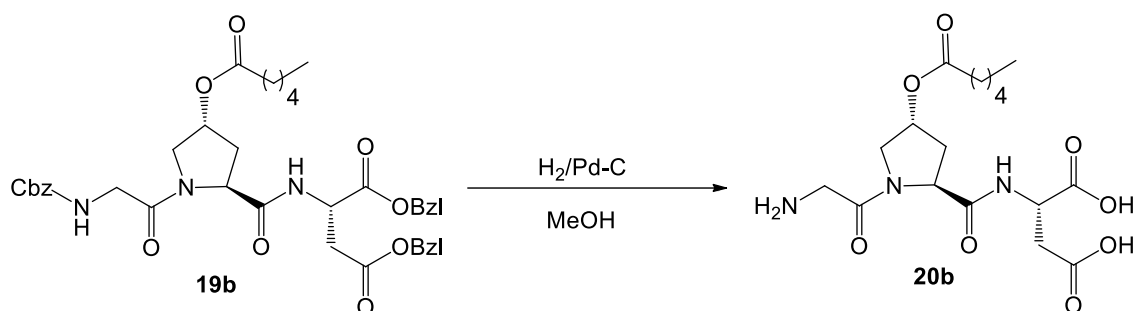
66,14 (CH₂, **CH**₂Ph); 58,87 (CH, C-2); 52,83–51,05 (CH₂, C-5); 49,33 (CH, C_{Asp}-2); 43,10 (CH₂, C_{Gly}-2); 14,00 (CH₃, (CH₂)₄**CH**₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 700,39 obtido 700,39







4.2.21 Síntese de ácido glicil-[(4*R*)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-aspartico

Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **15a** (seção 4.3.6.), procedeu-se á hidrogenólise do tripéptido **19b** (0,500 g; 0,72 mmol) num ambiente saturado de H₂ durante 4 horas.

Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida e recristilizou-se usando éter etílico obtendo-se um gel alaranjado (**20b**) (0,135 g). O rendimento da reação foi de 46,5%.

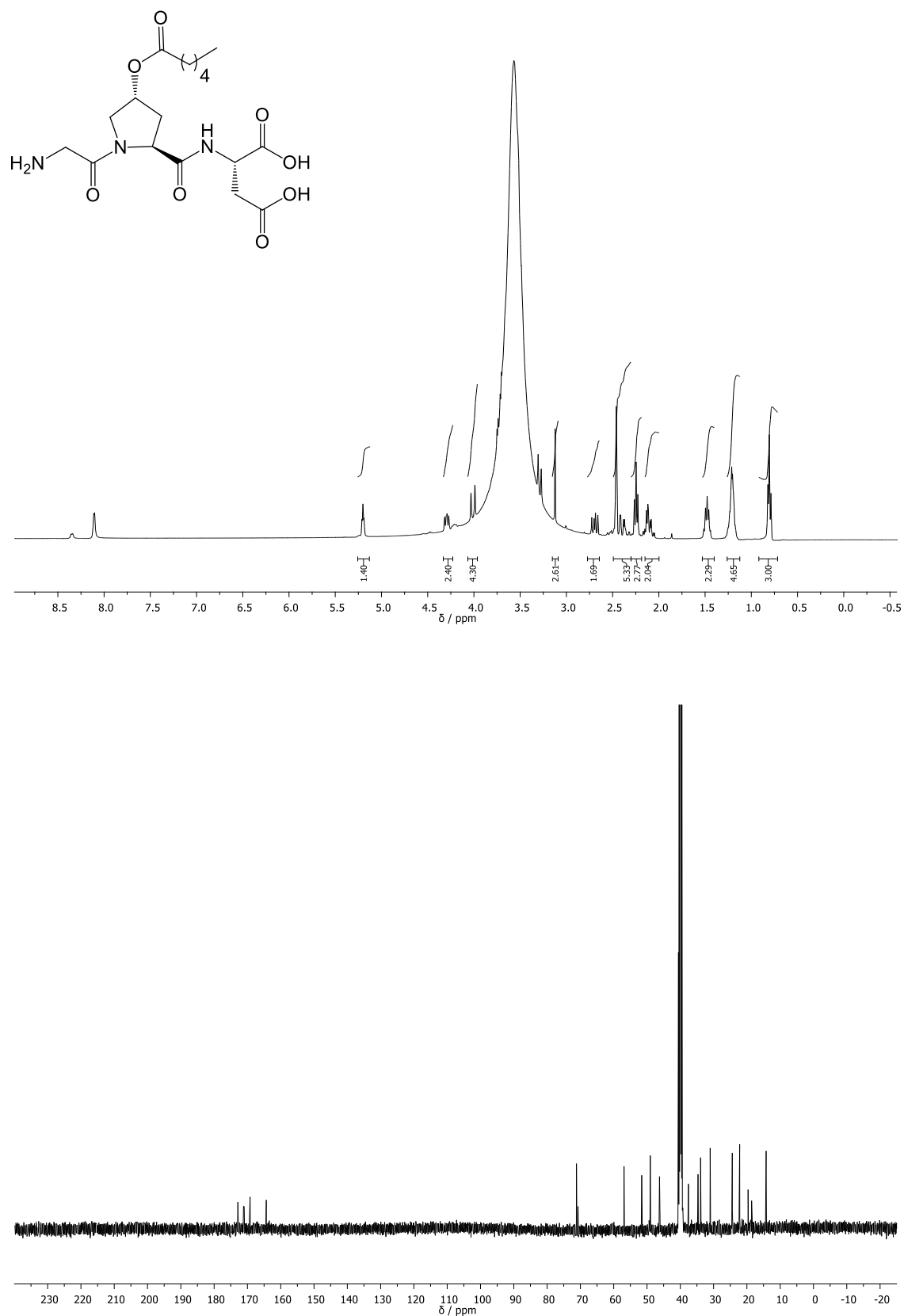
Composto: gel alaranjado

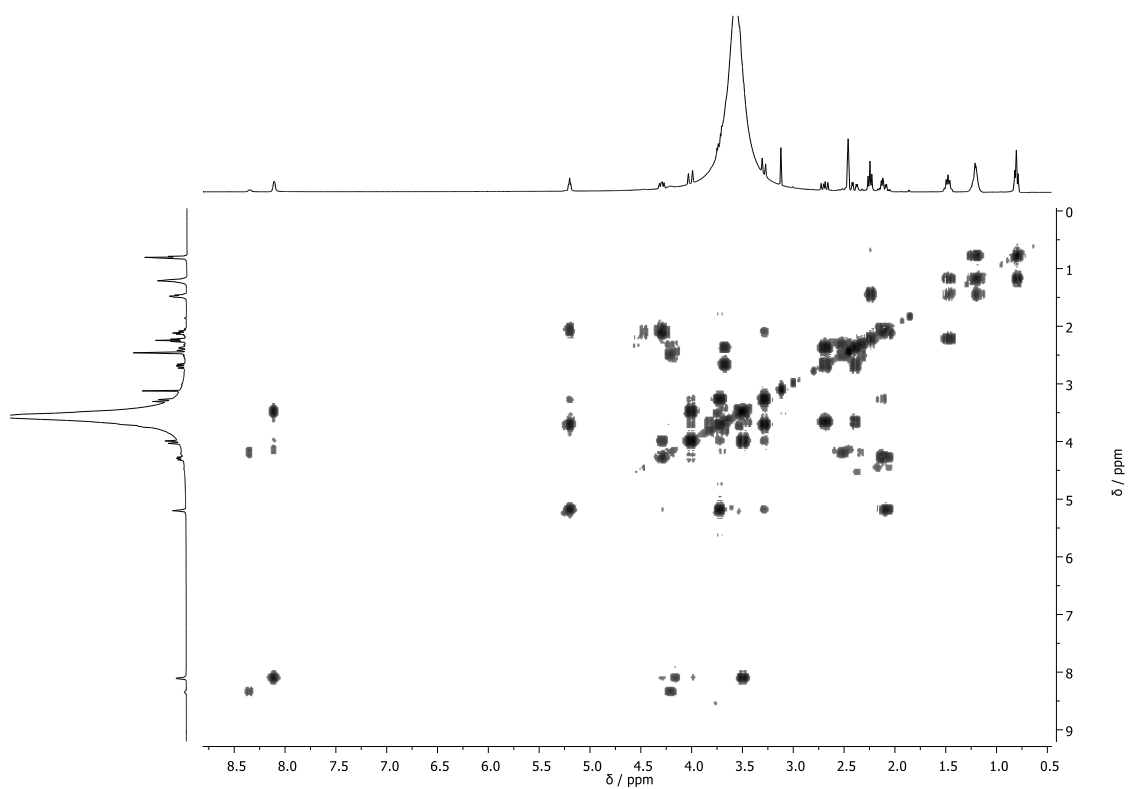
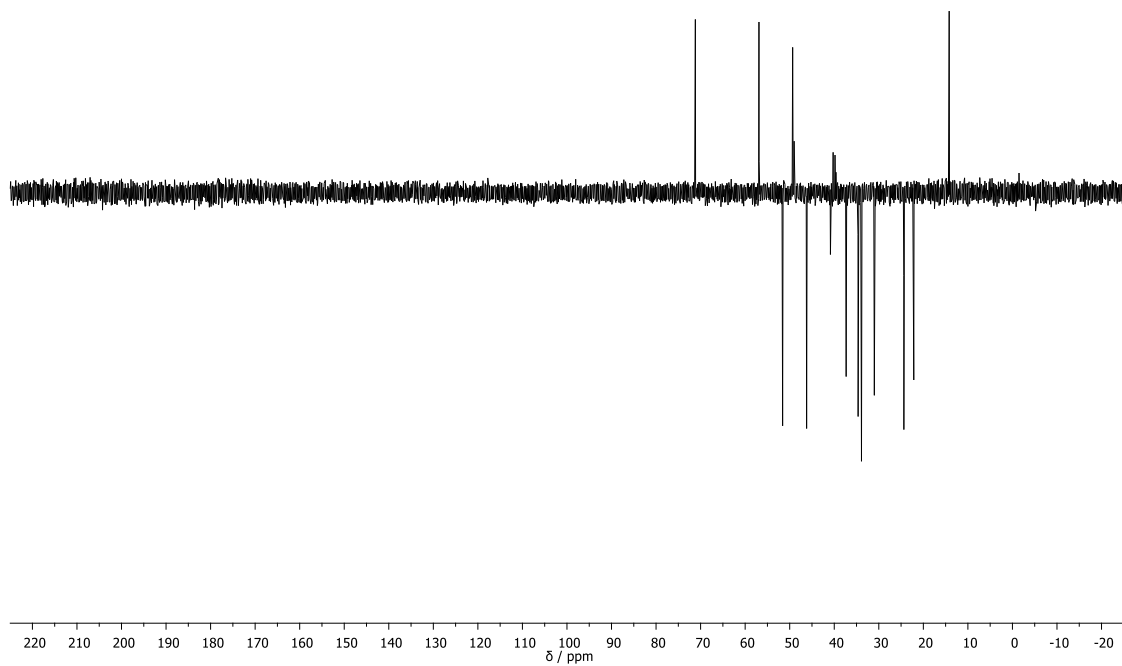
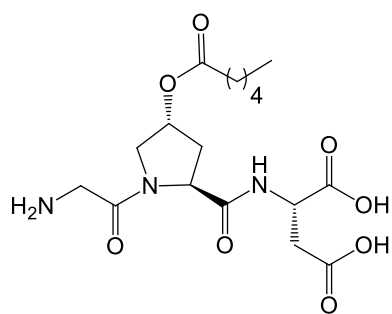
$$[\alpha]_D^{24} = -16 \text{ (} c1, \text{ MeOH)}$$

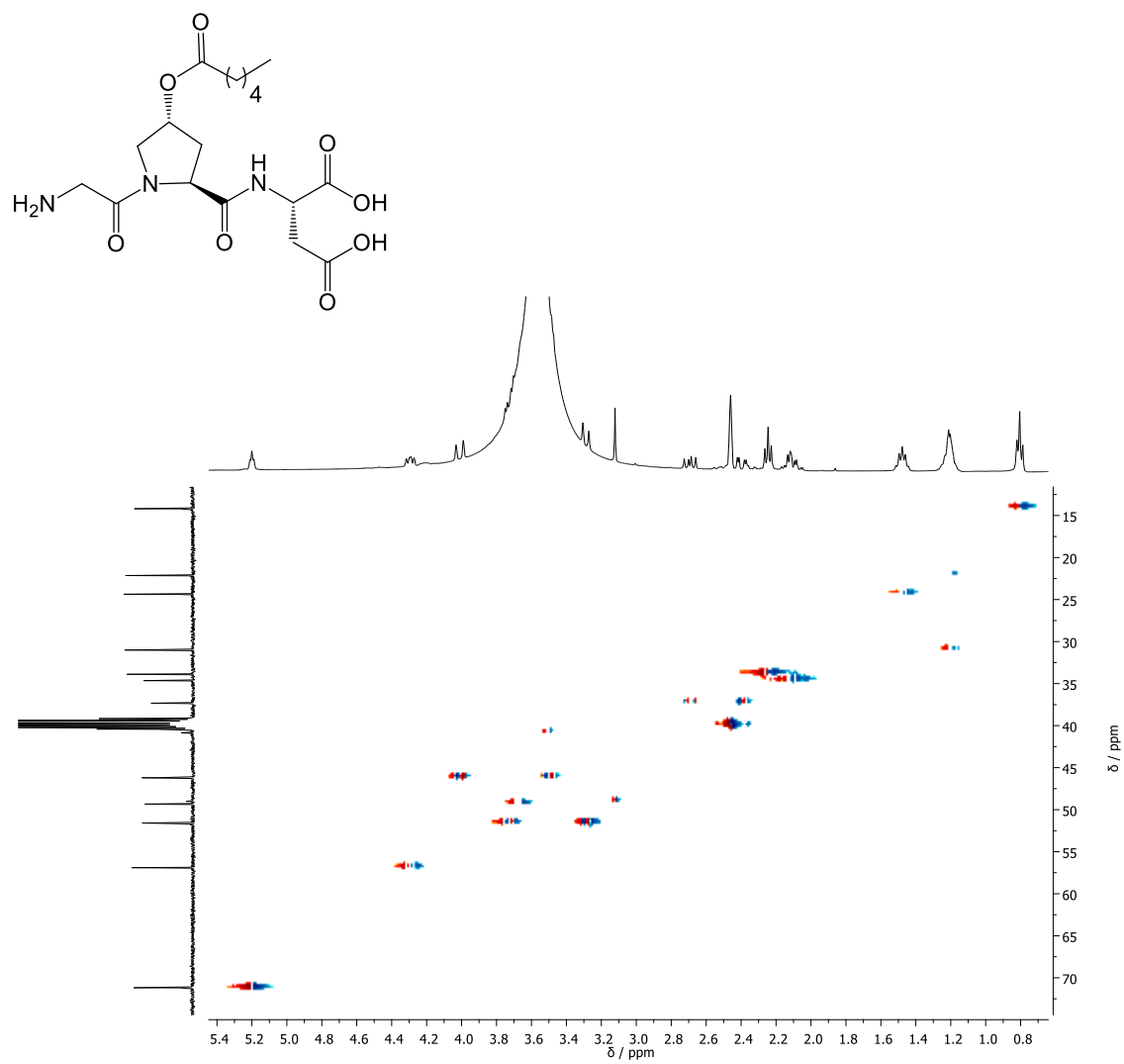
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 5,21 (dd, *J* = 12,1, 7,8 Hz, 1H, H-4); 4,33 – 4,23 (m, 2H, H-2); 3,99 (t, *J* = 13,5 Hz, 4H, H-5 + H_{Gly}-2); 3,12 (s, 3H, H-3 + H_{Asp}-2); 2,69 (dd, *J* = 16,1, 10,2 Hz, 2H); 2,49 – 2,30 (m, 5H); 2,30 – 2,19 (m, 3H); 2,15 – 2,00 (m, 2H); 1,53 – 1,40 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃); 1,26 – 1,12 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₃); 0,92 – 0,72 (m, 3H, (CH₂)₄CH₃)

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: [172,94 (C), 171,61 (C), 170,95 (C), 169,28 (C), 164,42 (C), COOH + CONH + COO]; 71,18 (CH, C-4); 56,90 (CH, C-2); 51,59 (CH₂, C-5); 49,17 (CH, C_{Asp}-2); 46,20 (CH₂, C_{Gly}-2); 14,20 (CH₃, (CH₂)₄CH₃)

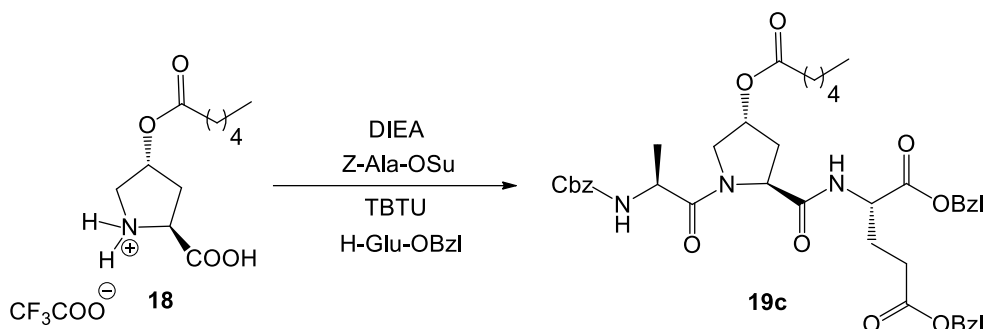
EM (ESI): *m/z* calculado para [M][−] 400,18, obtido 400,19







4.2.22 Síntese de Z-L-alil-[(4R)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-glutamato de dibenzilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **19a** (seção 4.3.18.), procedeu-se ao acoplamento duplo entre o aminoácido **30** (0,500 g; 2,60 mmol), a alanina ativada (**Z-Ala-OSu**) (0,659g, 2,60 mmol, 1 eq) e o ácido glutâmico protegido (**H-Glu-OBz**) (0,876 g, 2,41 mmol, 1.2 eq) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com HCl 1M e a fase aquosa com AcOEt. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente obtendo-se óleo transparente (**19c**) (0,950 g). O rendimento da reação foi de 63,8%.

Composto: óleo transparente

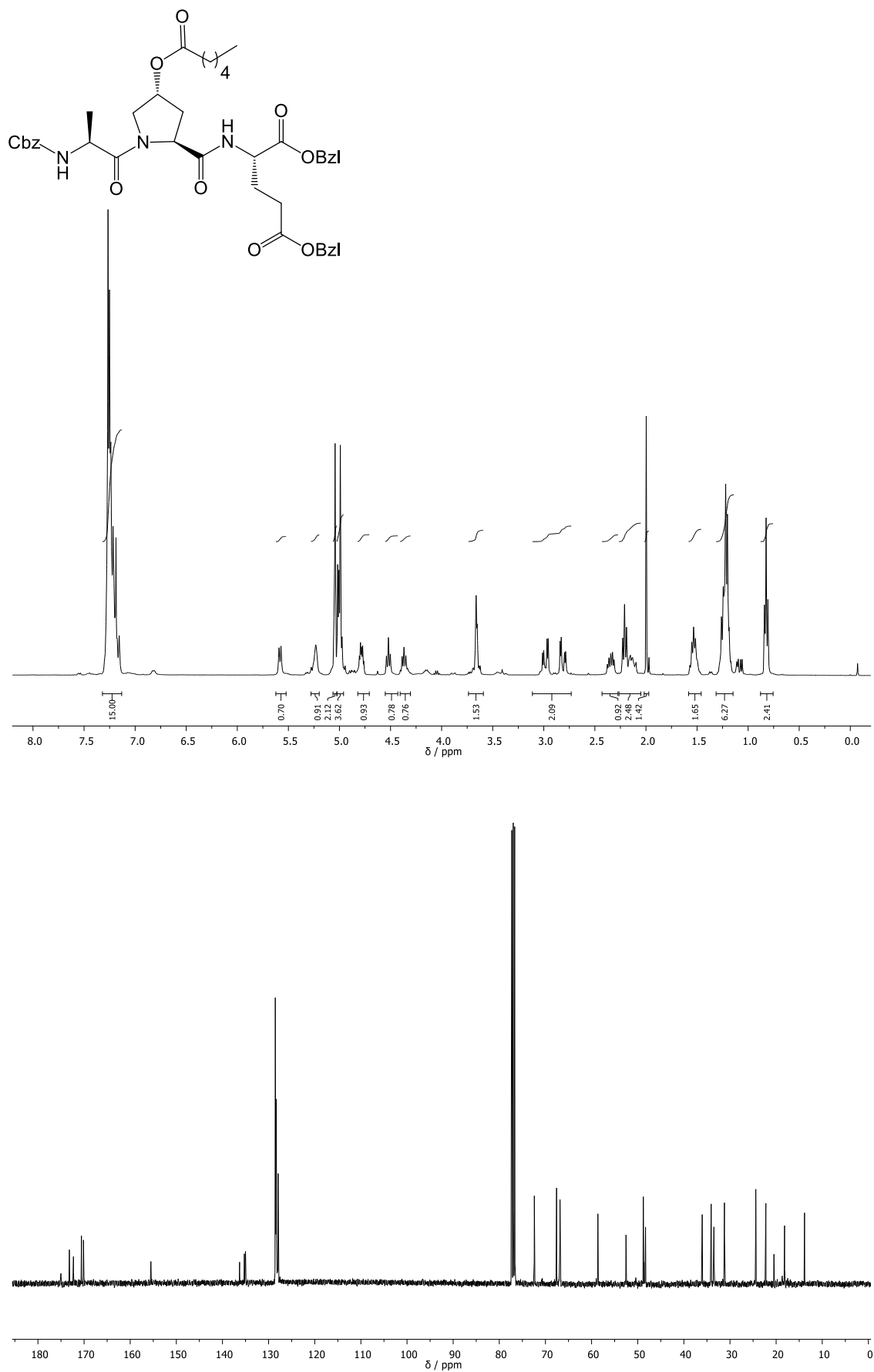
Rf: 0,80 em AcOEt

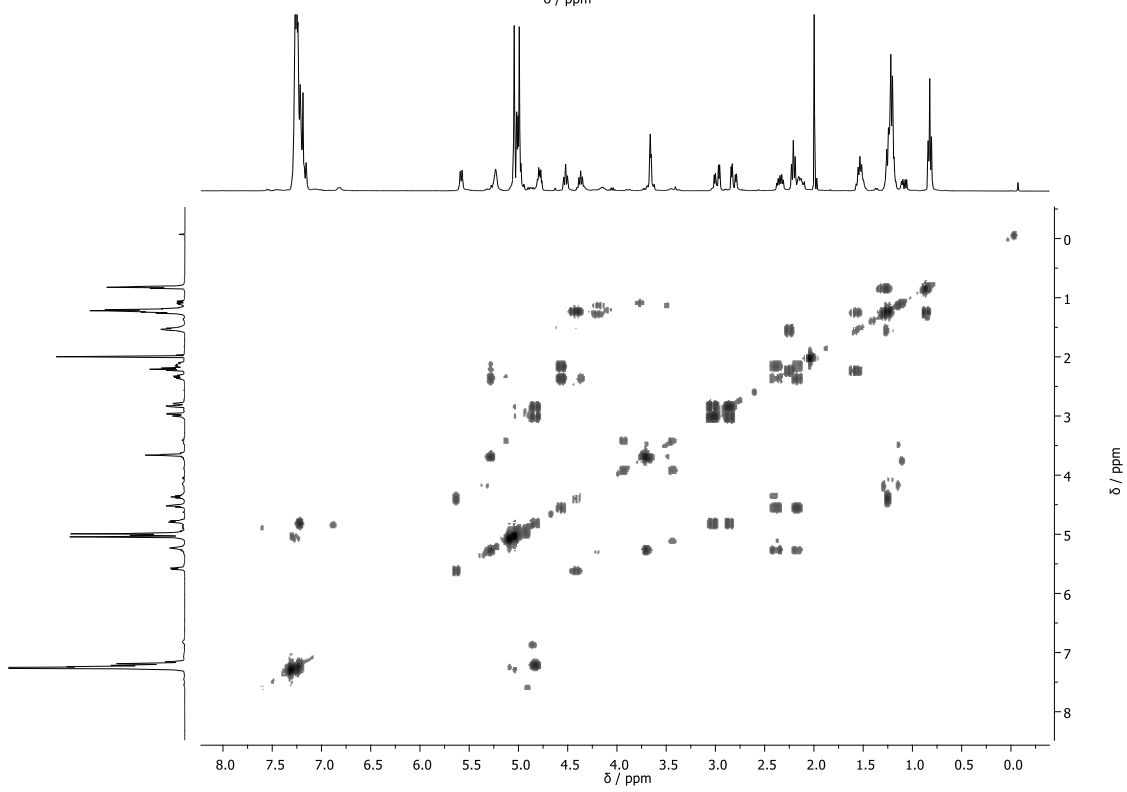
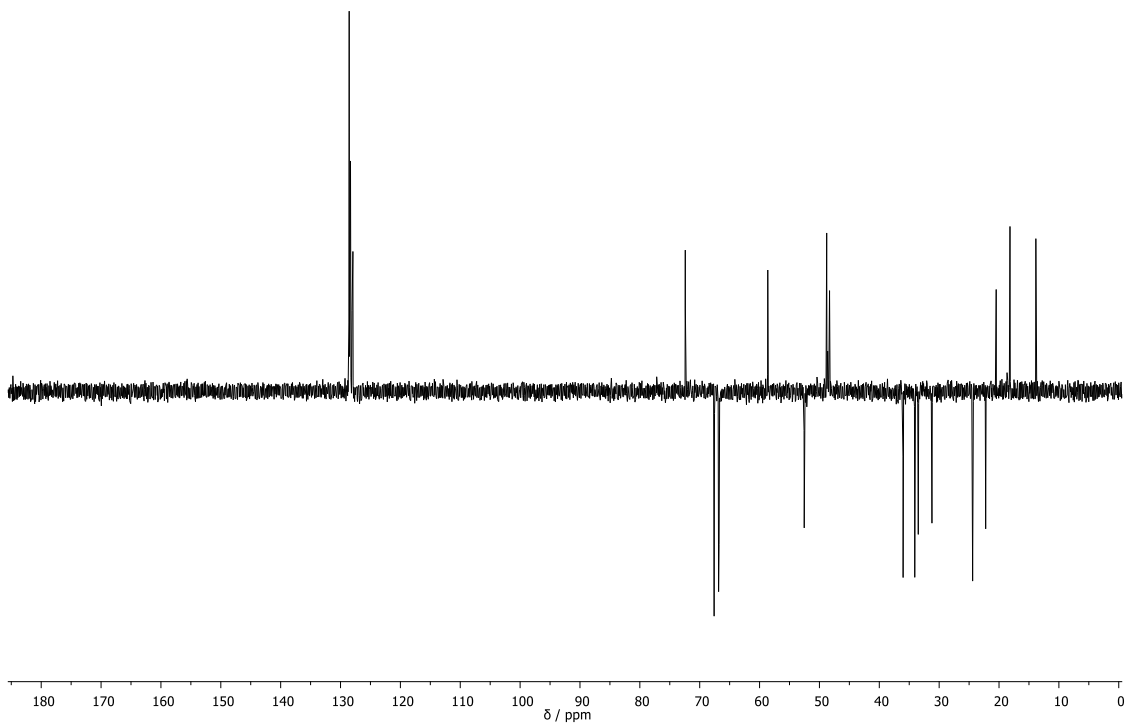
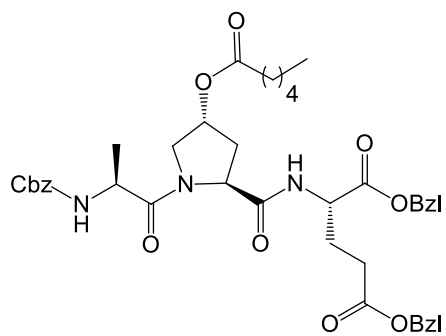
$[\alpha]_D^{24} = -66$ (c1, MeOH)

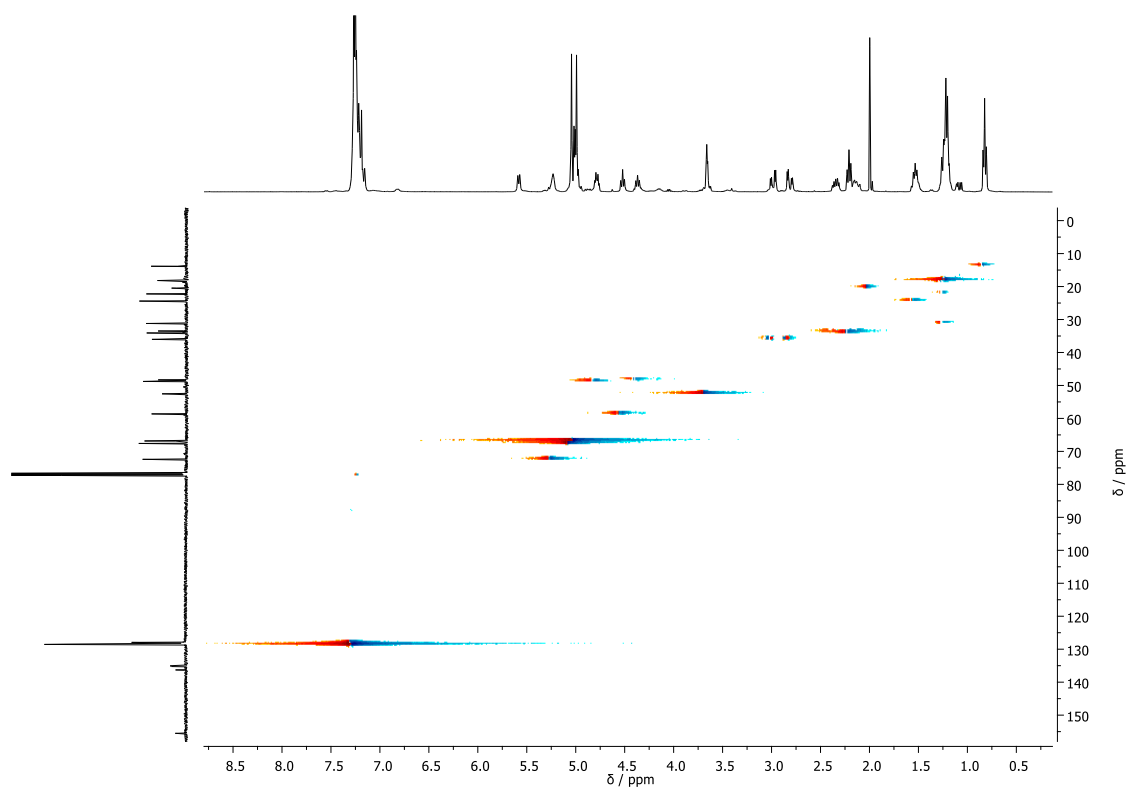
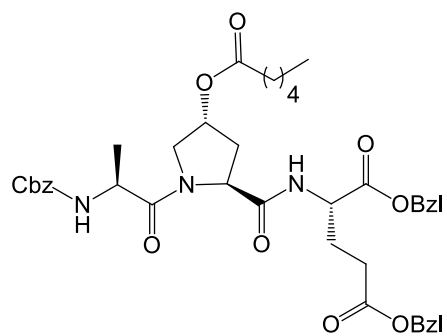
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,32–7,13 (m, 15H, 3xPh); 5,58 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, CONH); 5,25 (m, 1H, H-4); 5,11–4,93 (m, 6H, 3xCH₂Ph); 4,78 (dt, *J* = 8,7, 4,5 Hz, 1H, H_{Glu}-2); 4,52 (m, 1H, H_{Ala}-2); 4,37 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, H-2); 3,74–3,59 (m, 2H, H-5); 3,11–2,73 (m, 2H); 2,43–2,27 (m, 1H); 2,21 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 2,13 (dd, *J* = 12,6, 9,2 Hz, 1H); 1,98 (d, *J* = 9,8 Hz, 2H); 1,58–1,46 (m, 2H); 1,31–1,15 (m, 6H, CH₂CH₂CH₃ + H_{Ala}-3); 0,82 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, (CH₂)₄CH₃)

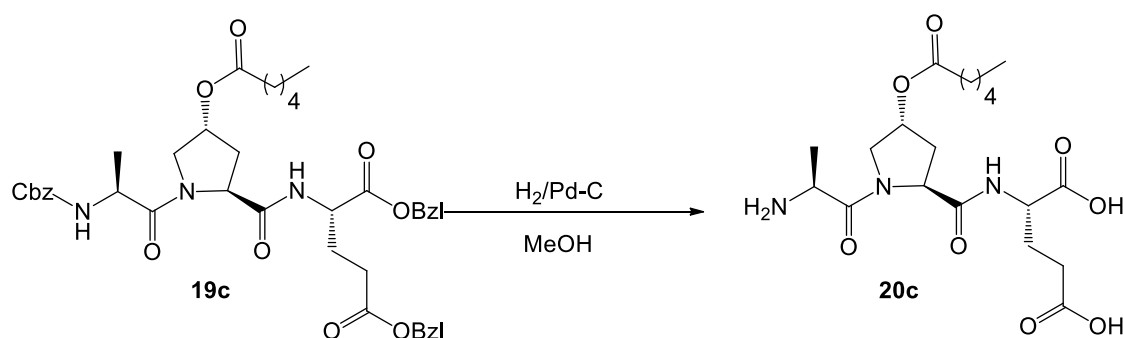
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [175,12–174,96 (C), 173,19 (C), 172,30 (C), 170,57 (C), 170,10 (C), COOBzl + COO + CONH + CON]; 129,22–127,21 (CH, Ph); 72,41 (CH, C-4); 69,15–66,14 (CH₂, CH₂Ph); 58,63 (CH, C-2); 52,54 (CH₂, C-5); 48,71 (CH, C_{Ala}-2); 48,31 (CH, C_{Glu}-2); 18,17 (CH₃, C_{Ala}-3); 13,85 (CH₃, (CH₂)₄CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 756,31 obtido 756,30







4.2.23 Síntese de ácido L-alil-[(4*R*)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-glutâmico

Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **15** (seção 4.3.6.), procedeu-se à hidrogenólise do tripéptido **35** (0,500 g; 1,16 mmol) num ambiente saturado de H₂ durante 4 horas.

Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida e recristalizou-se usando éter etílico obtendo-se um gel alaranjado (**36**) (0,260 g). O rendimento da reação foi de 52,5 %.

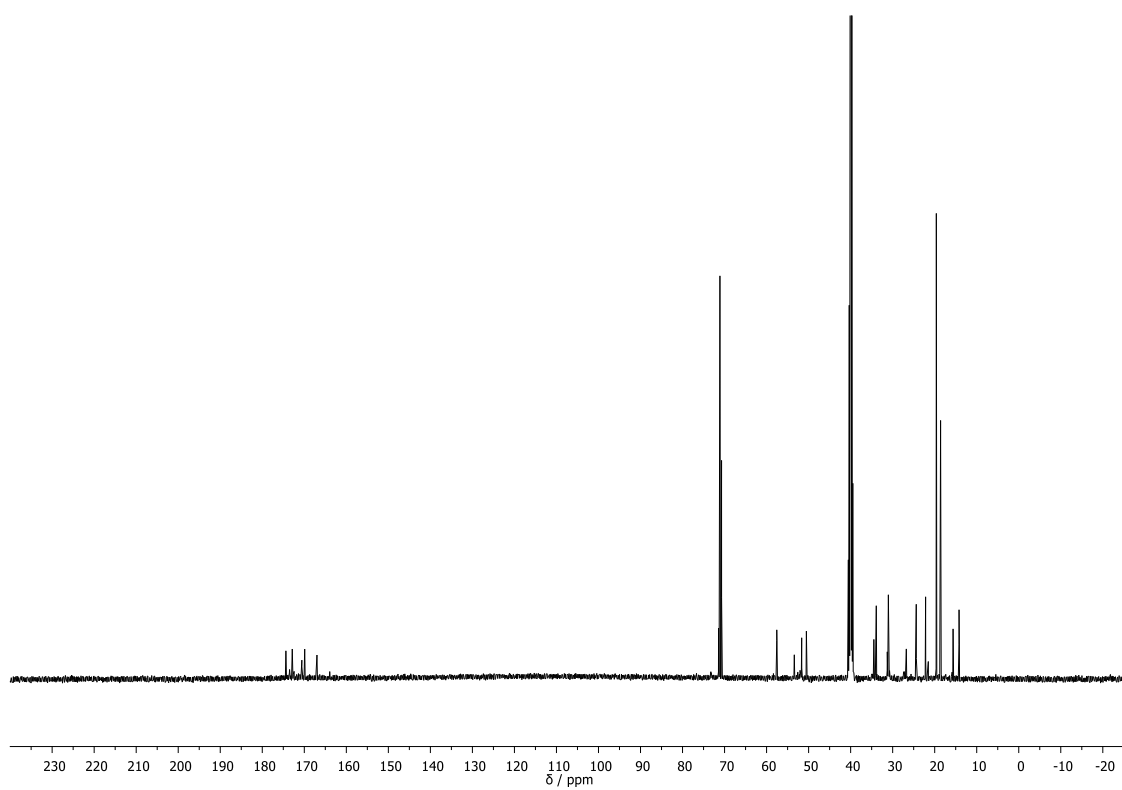
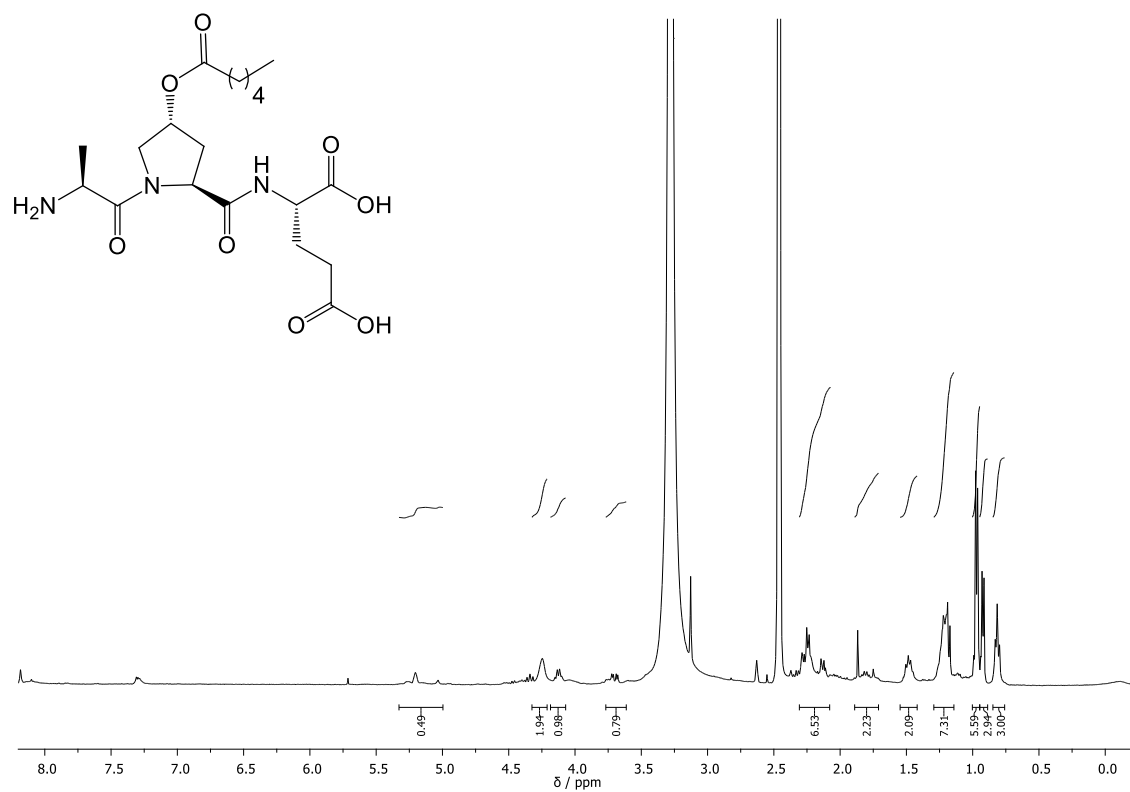
Composto: gel alaranjado

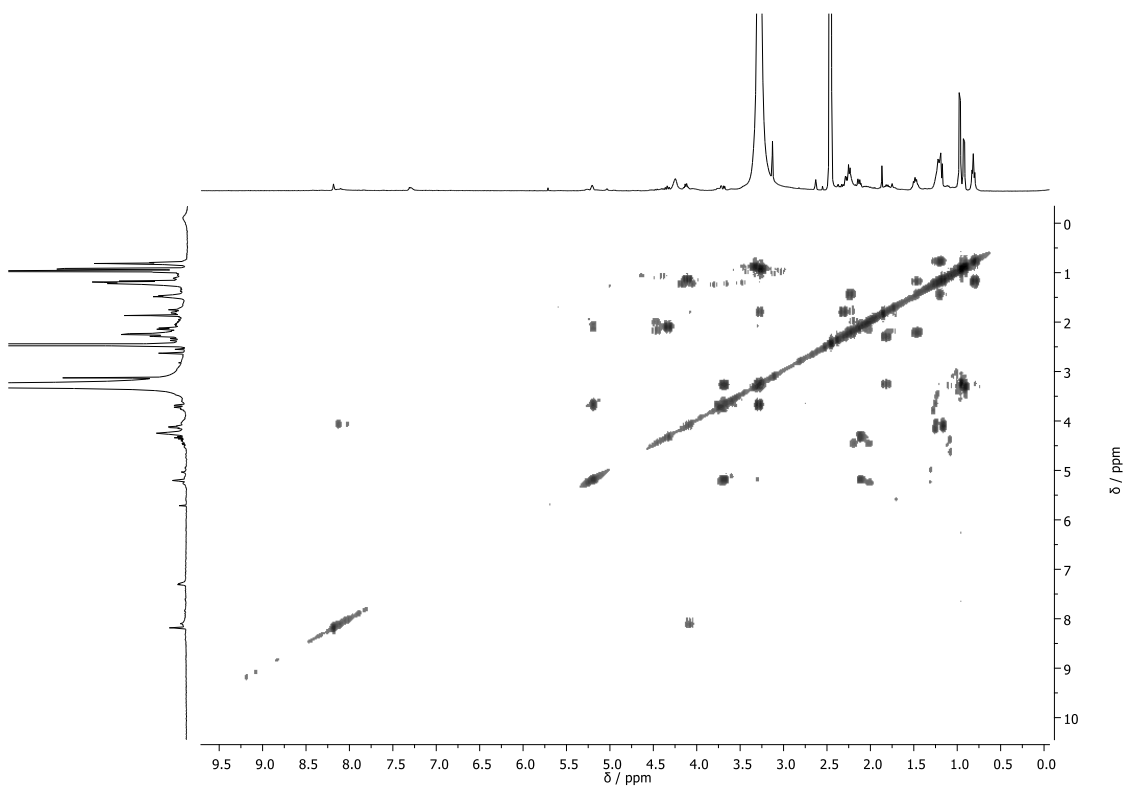
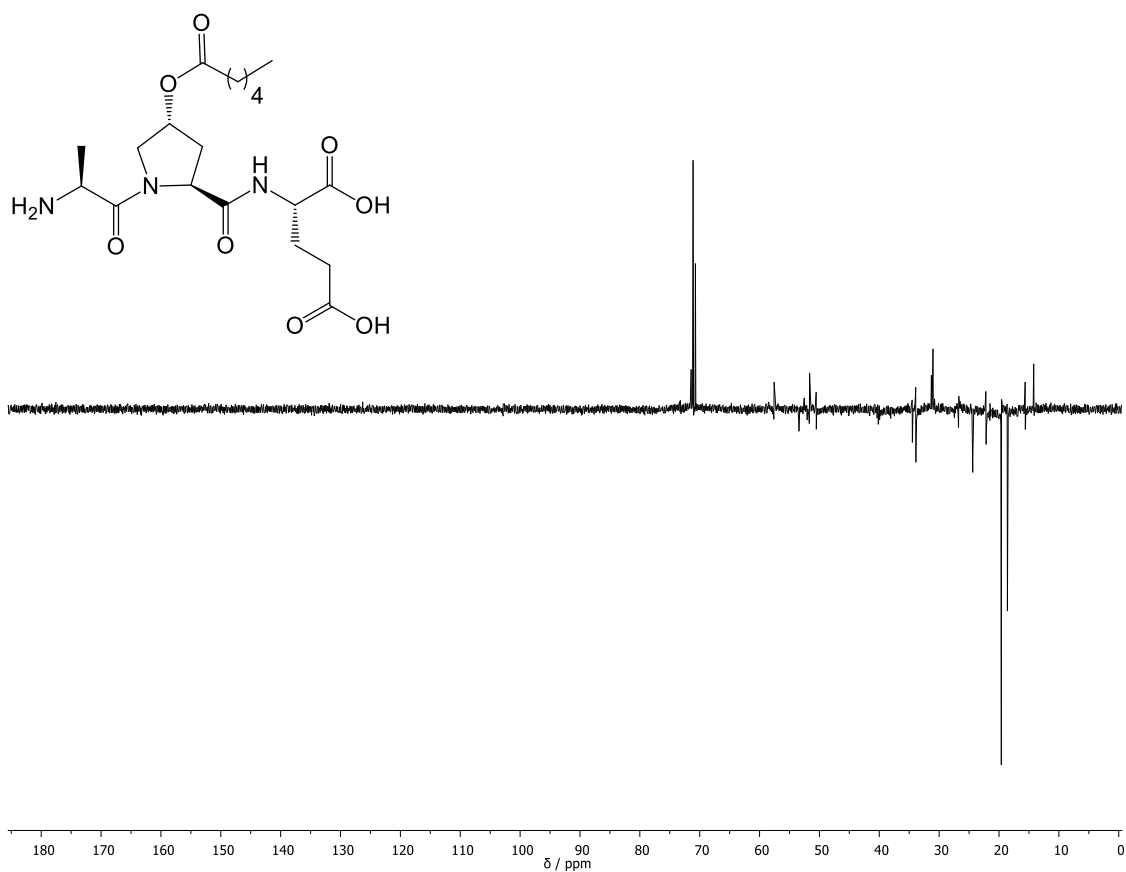
$$[\alpha]_D^{24} = -13 \text{ (} c1, \text{ MeOH)}$$

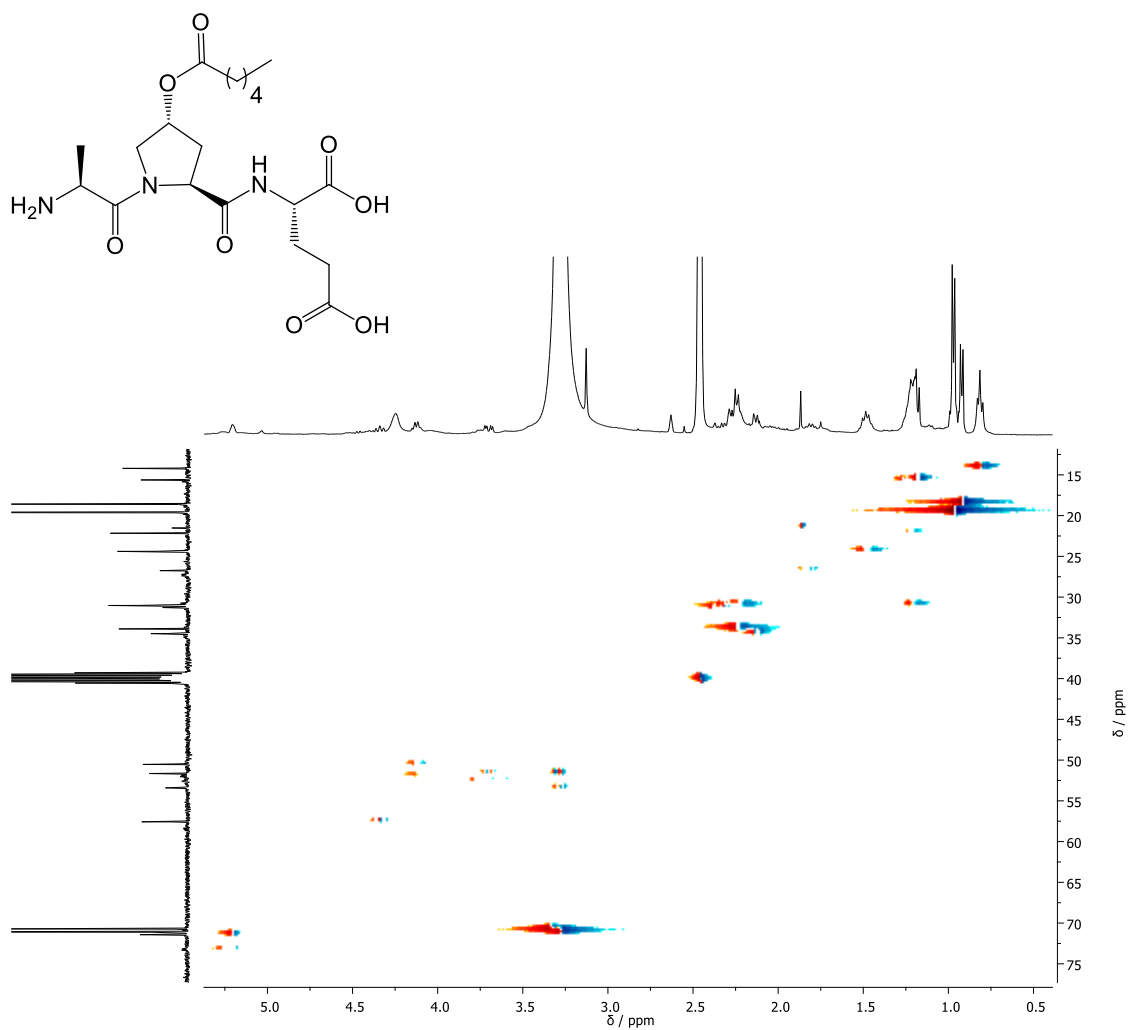
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 5,39–4,98 (m, 1H, H-4); 4,28 (d, *J* = 28,6 Hz, 2H, H-2+ H_{Glu}-2); 4,18–4,07 (m, 1H, H_{Ala}-2); 3,77–3,61 (m, 1H); 2,31–2,08 (m, 6H); 1,89–1,71 (m, 2H); 1,55–1,42 (m, 2H); 1,19 (dd, *J* = 11,3, 8,6 Hz, 7H); 1,00–0,94 (m, 6H); 0,93 (t, *J* = 4,8 Hz, 3H, H_{Ala}-3); 0,81 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, (CH₂)₄CH₃),

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: [174,38 (C), 172,86 (C), 170,58 (C), 169,90 (C), 166,99 (C), COOH + CONH + COO]; 70,72 (CH, C-4); 57,57 (CH, C-2); 53,41 (CH₂, C-5); 51,64 (CH, C_{Glu}-2); 50,53 (CH, C_{Ala}-2); 15,62 (CH₃, C_{Ala}-3); 14,21 (CH₃, (CH₂)₄CH₃)

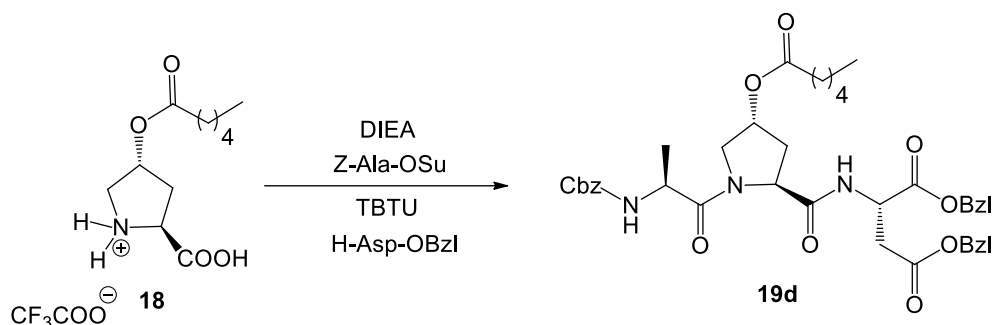
EM (ESI): m/z calculado para [M][−] 428,21, obtido 428,19







4.2.24 Síntese de Z-L-alil-[(4*R*)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-aspartato de dibenzilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **19a** (secção 4.3.18.), procedeu-se ao acoplamento duplo entre o aminoácido 29 (0,250 g; 1,03 mmol), a alanina ativada (**Z-Ala-OSu**) (0,330g, 1,03mmol, 1 eq) e o ácido aspártico protegido (**H-Asp-OBz**) (0,600 g, 1,24 mmol, 1.2 eq) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com HCl 1M e a fase aquosa com AcOEt. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente obtendo-se óleo transparente (**19d**) (0,750 g). O rendimento da reação foi de 80,0%.

Composto: óleo transparente

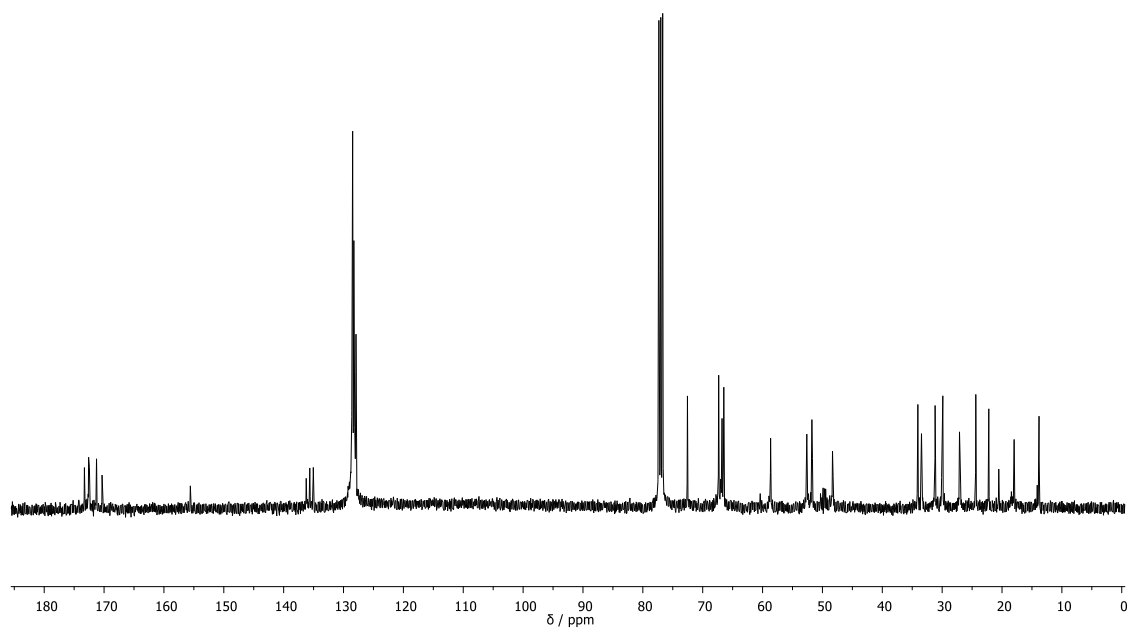
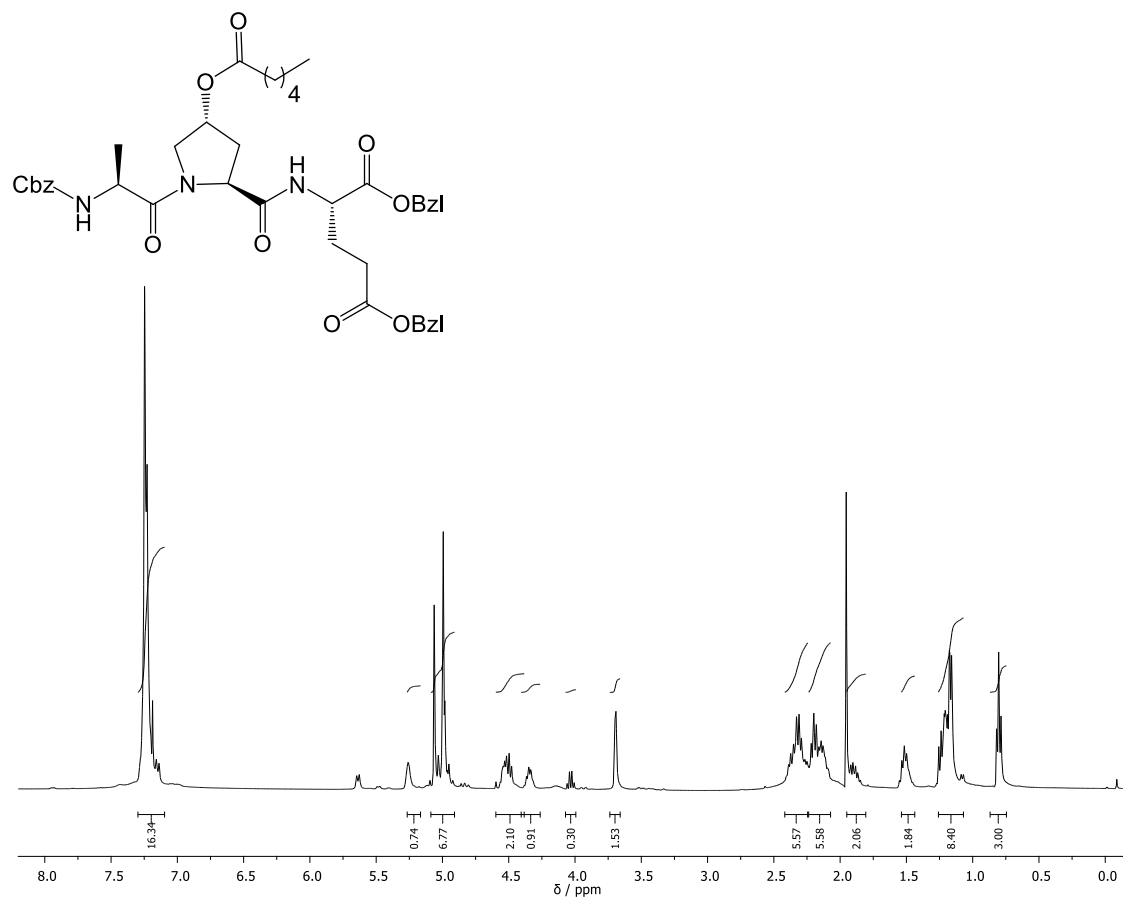
R_f: 0,82 em AcOEt

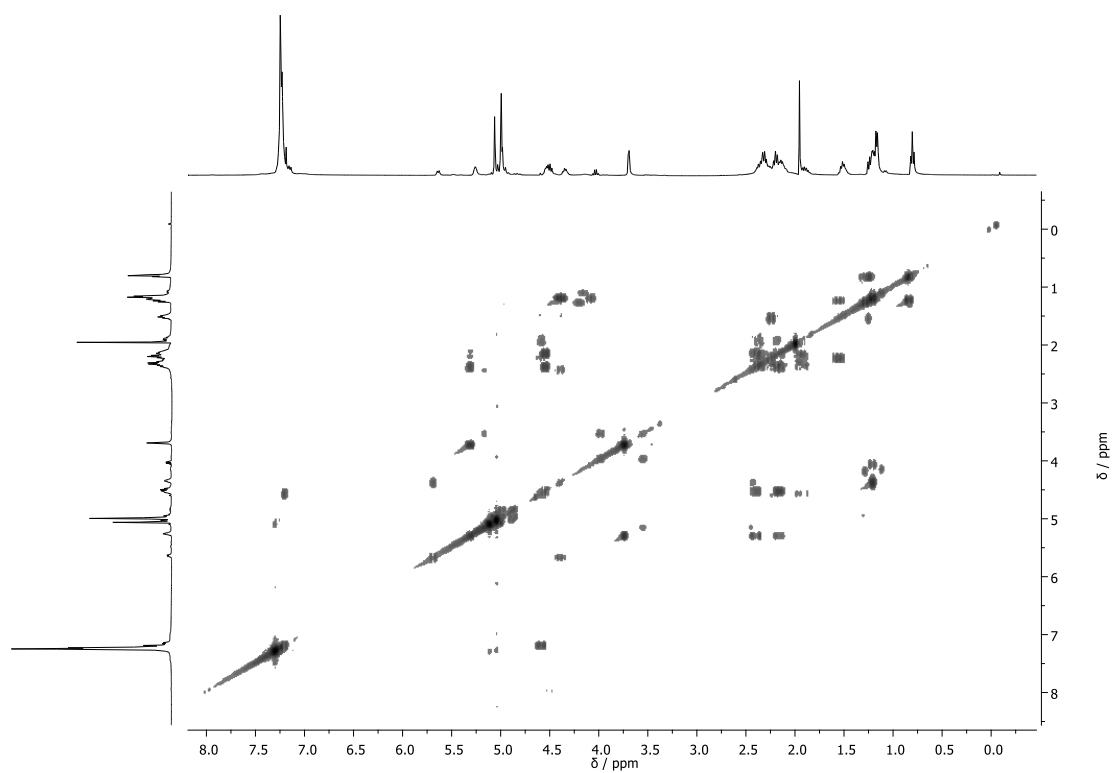
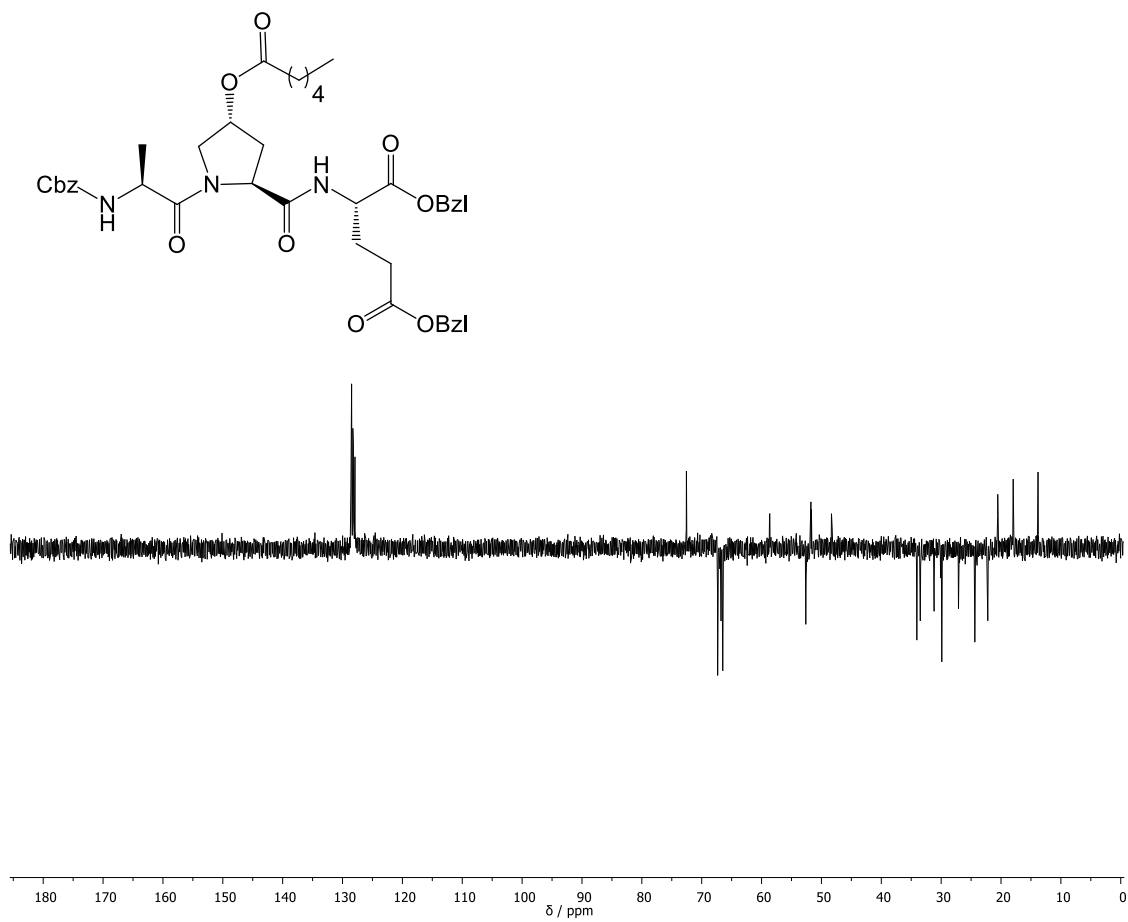
[α]_D²⁴ = – 27 (c1, MeOH)

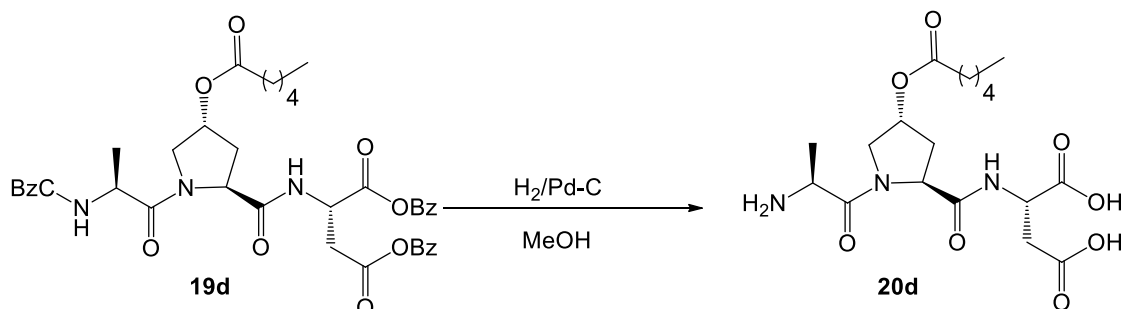
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,42–6,94 (m, 15H, 3xPh); 5,22 (d, J = 33,0 Hz, 1H, H-4); 5,14–4,76 (m, 6H, 3xCH₂Ph); 4,60–4,46 (m, 2H, H-2 + H_{Asp}-2); 4,36 (m, 1H, H_{Ala}-2); 4,09 – 3,90 (m, 1H); 3,69 (d, J = 2,9 Hz, 2H, H-5); 2,47 – 2,01 (m, 11H); 1,99 – 1,72 (m, 4H); 1,58 – 1,41 (m, 2H); 1,29 – 0,98 (m, 7H, CH₂CH₂CH₃ + H_{Ala}-3); 0,89 – 0,72 (t, 3H, J = 6,8 Hz, (CH₂)₄CH₃)

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [173,28 (C); 172,52 (C); 171,26 (C); 170,34 (C); CO₂Bzl + COO + CONH + CONH], 129,73–127,34 (CH, Ph); 72,55 (CH, C-4); 66,63 (CH₂, CH₂Ph); 58,62 (CH, C-2); 52,61 (CH₂, C-5); 51,71 (CH, C_{Asp}-2); 48,32 (CH, C_{Ala}-2); 17,97 (CH₃, C_{Ala}-3); 13,82 (CH₃, (CH₂)₄CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 727,35 obtido 727,33





4.2.25 Síntese de ácido L-alil-[(4*R*)-4-hexanoiloxi-L-prolil]-L-aspartico

Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **15a** (secção 4.3.6.), procedeu-se á hidrogenólise do tripéptido **19a** (0,500 g; 1,16 mmol) num ambiente saturado de H₂ durante 4 horas.

Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida e no caso deste composto não foi possível recristalizar sendo necessário recorrer ao seu isolamento por cromatografia em coluna usando MeOH como eluente obtendo-se um gel alaranjado (**20d**) (0,200 g). O rendimento da reação foi de 41,5 %.

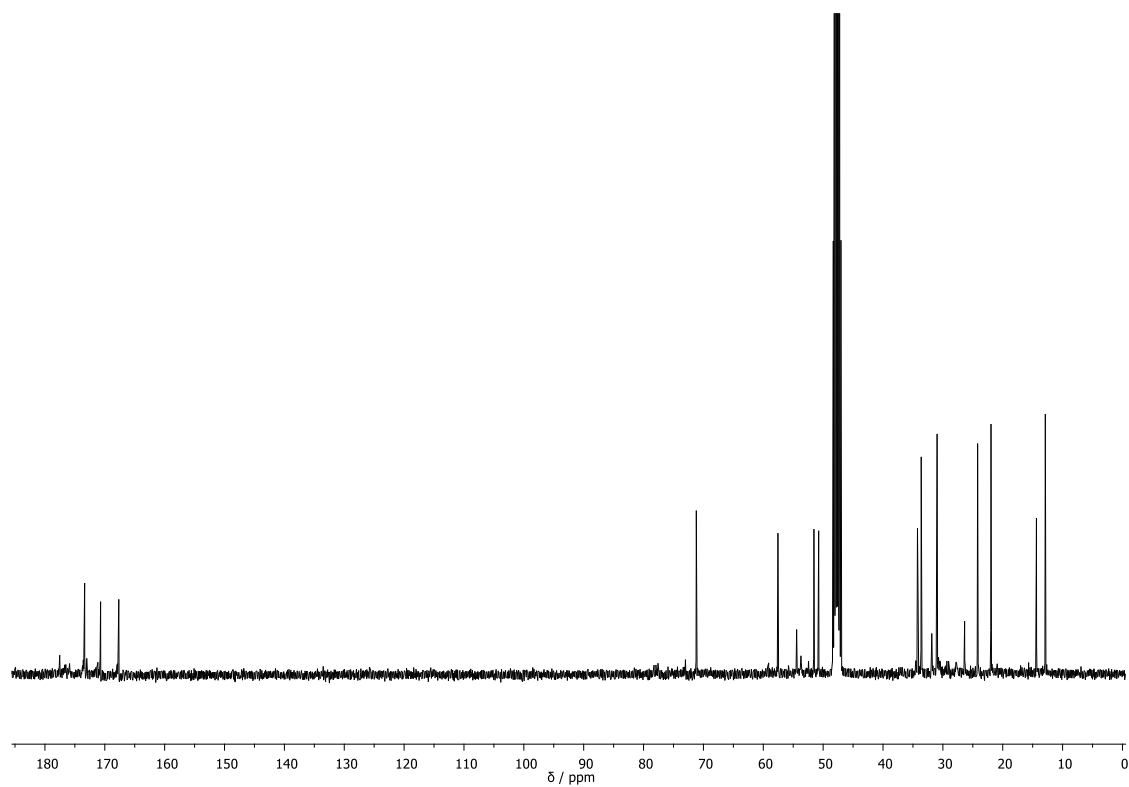
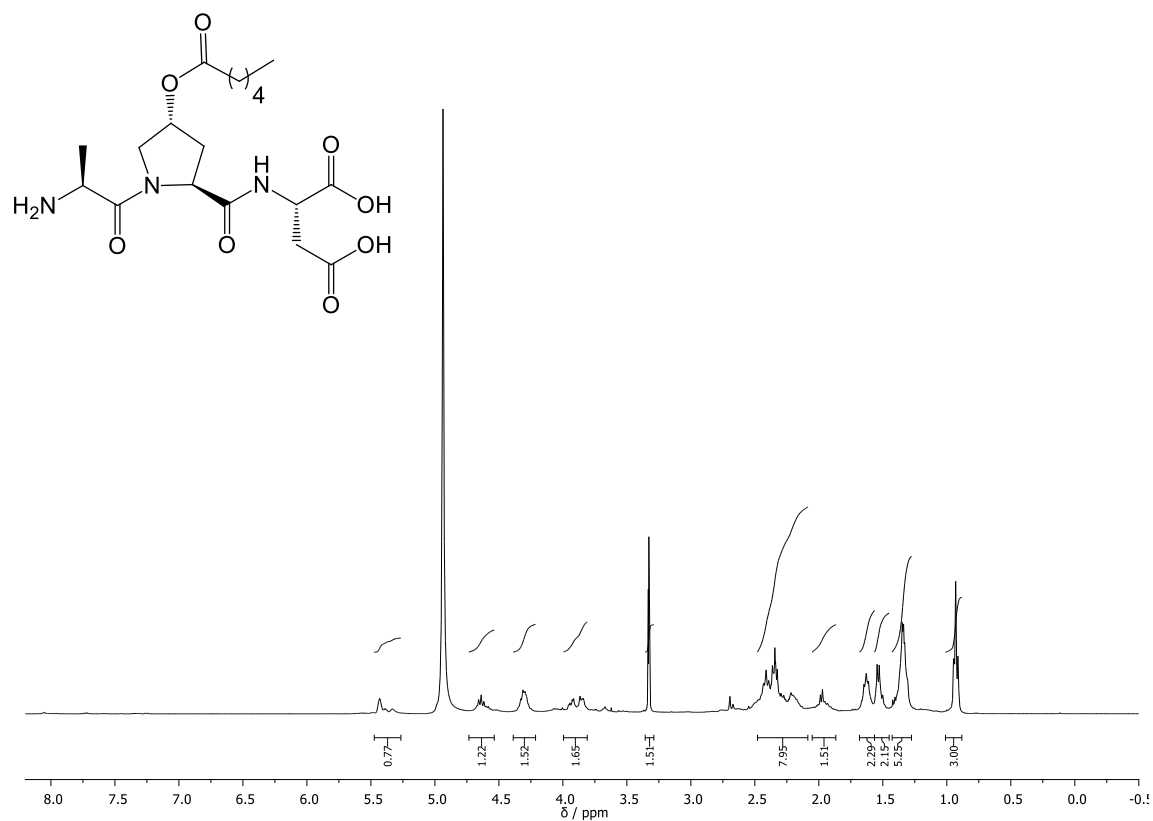
Composto: gel alaranjado

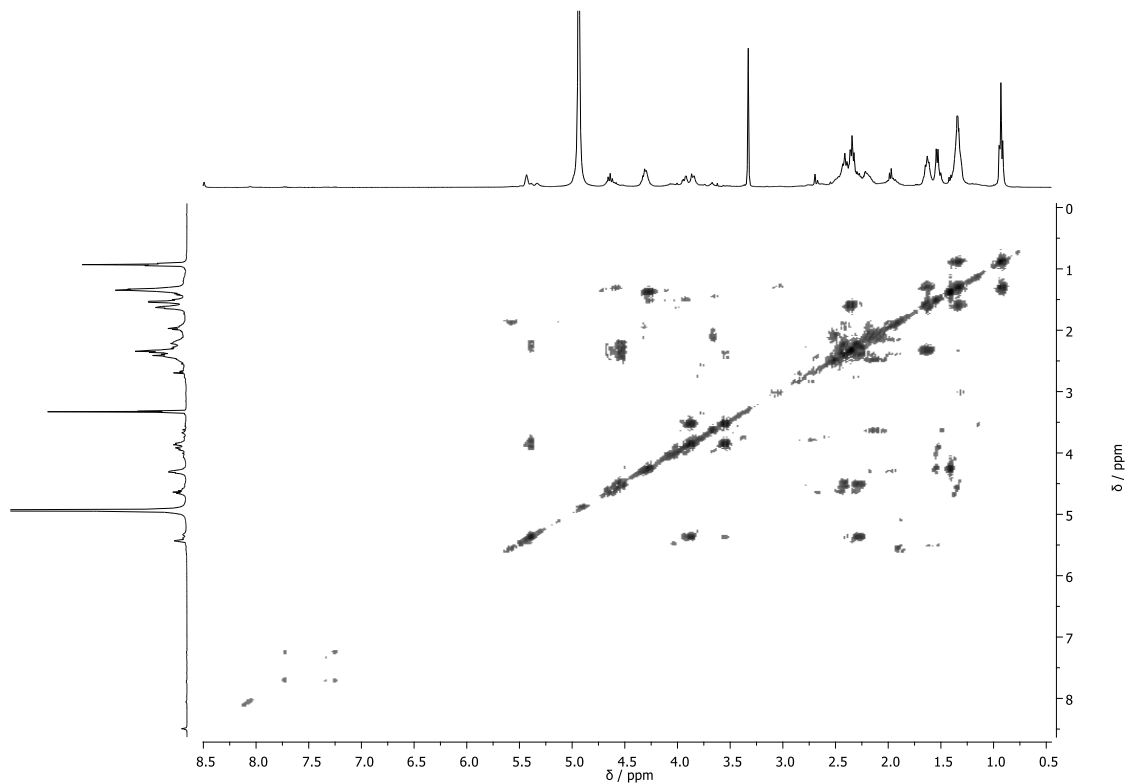
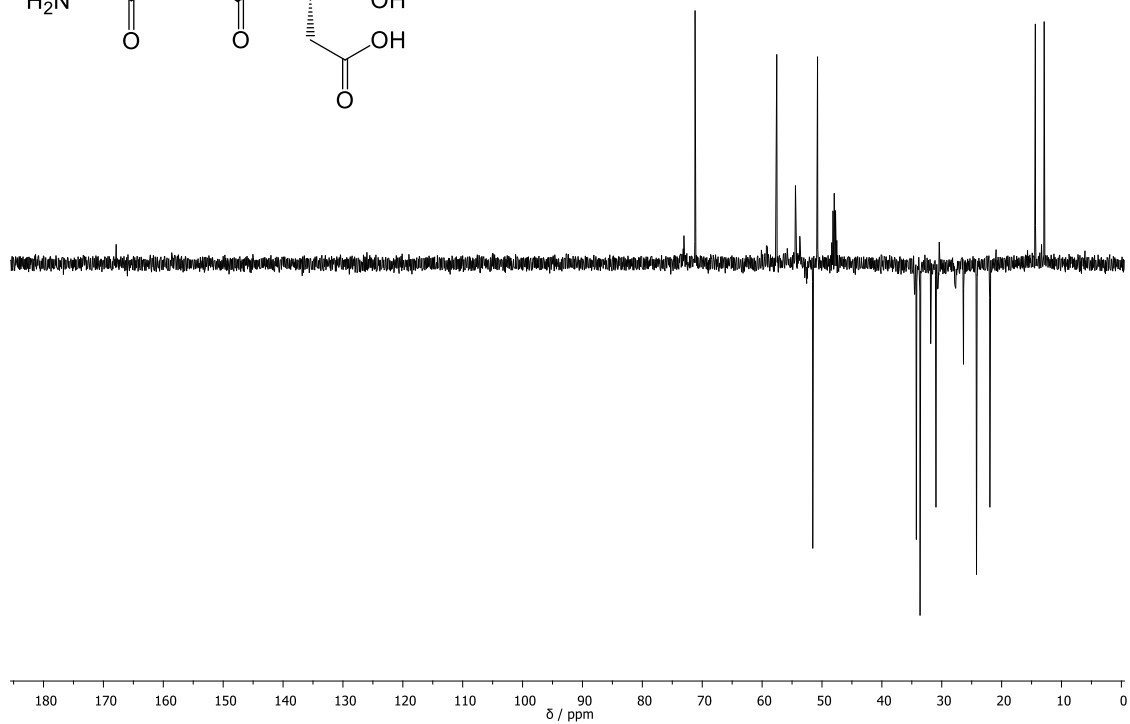
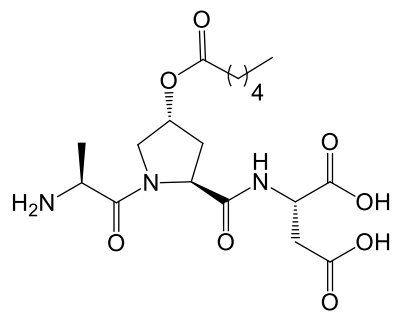
$$[\alpha]_D^{24} = -16 \text{ (c1, MeOH)}$$

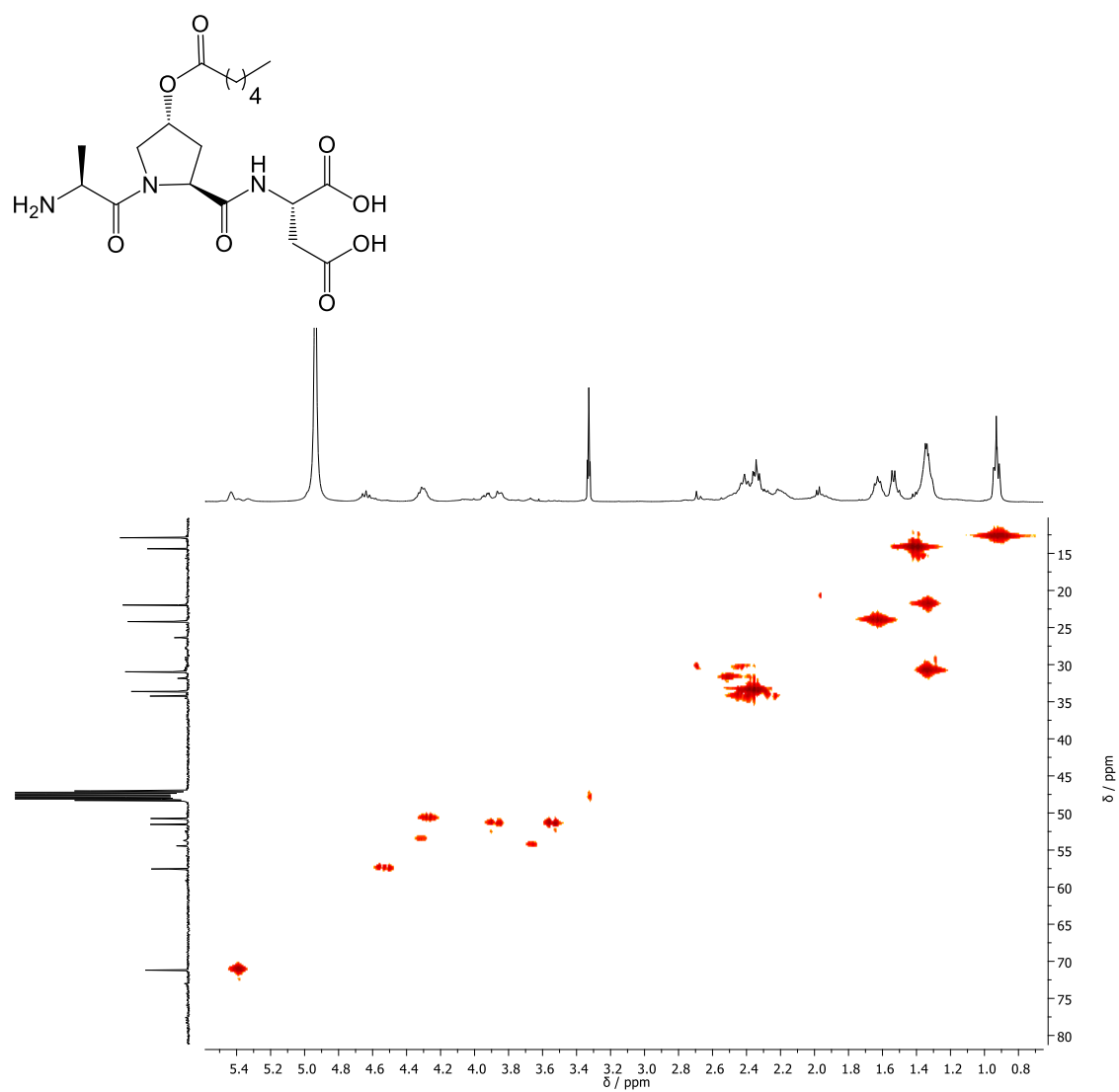
¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ: 5,48–5,24 (m, 1H, H-4); 4,74–4,54 (m, 1H, H-4); 4,30 (dd, $J = 19,1, 12,3$ Hz, 1H, H_{Asp-2}); 3,98–3,79 (m, 2H, H-5 + H_{Ala-2}); 2,53–2,13 (m, 8H); 2,06–1,85 (m, 1H); 1,67–1,44 (m, 4H); 1,44–1,24 (m, 6H, H_{Ala-3} + CH₂CH₂CH); 0,98–0,88 (t, $J = 6,8$ Hz 3H, (CH₂)₄CH₃)

¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [173,18 (C), 170,70 (C), 167,66 (C), CO₂H + CONH + COO]; 71,19 (CH, C-4); 57,55 (CH, C-2); 54,43 (CH, C_{Ala-2}); 51,54 (CH₂, C-5); 50,74 (CH, C_{Asp-2}); 14,37 (CH₃, C_{Ala-3}); 12,89 (CH₃, (CH₂)₄CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁻ 414,20, obtido [M]⁻ 414,19

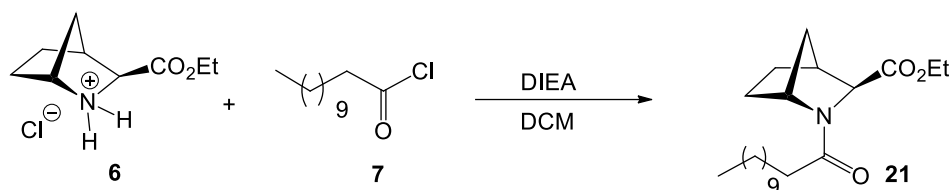






4.3 Síntese dos derivados de PLG

4.3.1 Síntese de (1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carboxilato de etilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **9w** (secção 4.3.1.), procedeu-se á condensação do cloreto de lauroílo (**7**) com o aminoéster **6** (0,300 g; 1,45 mmol) durante 8h. Posteriormente, realizou-se o tratamento corrente obtendo-se um óleo amarelado (**21**) (0,490 g). O rendimento da reação foi de 96,0%.

Composto: óleo amarelado

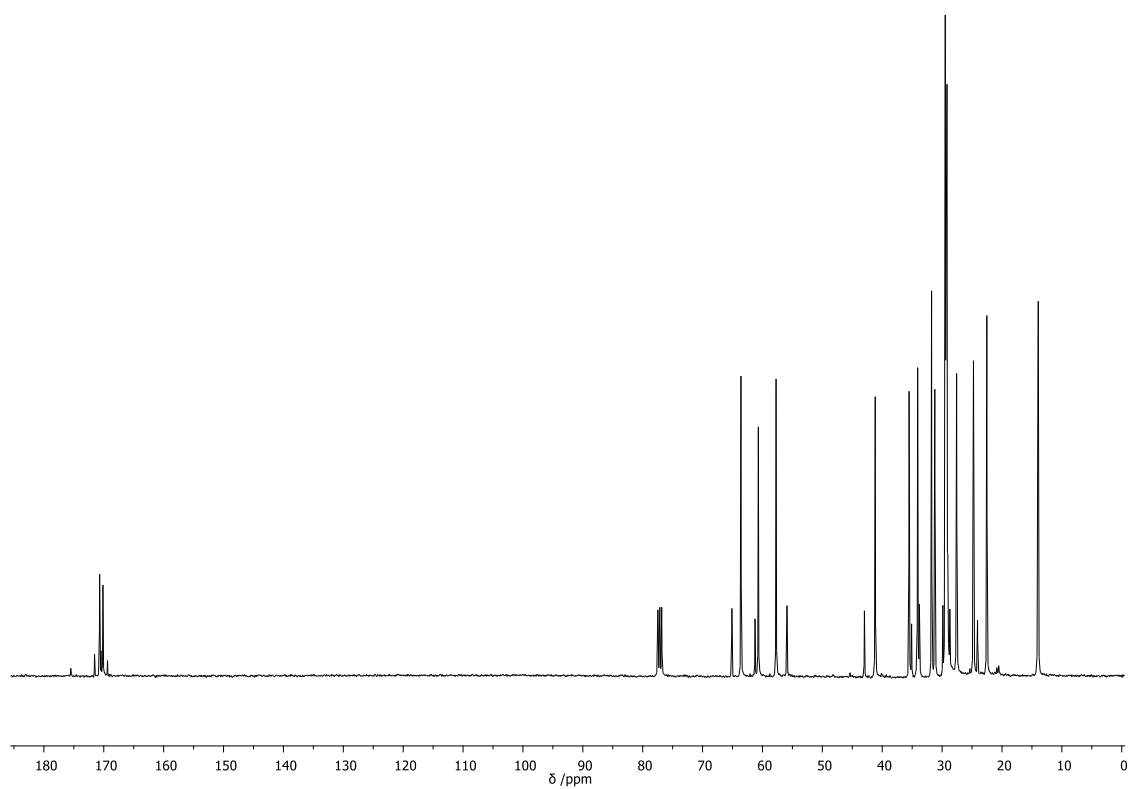
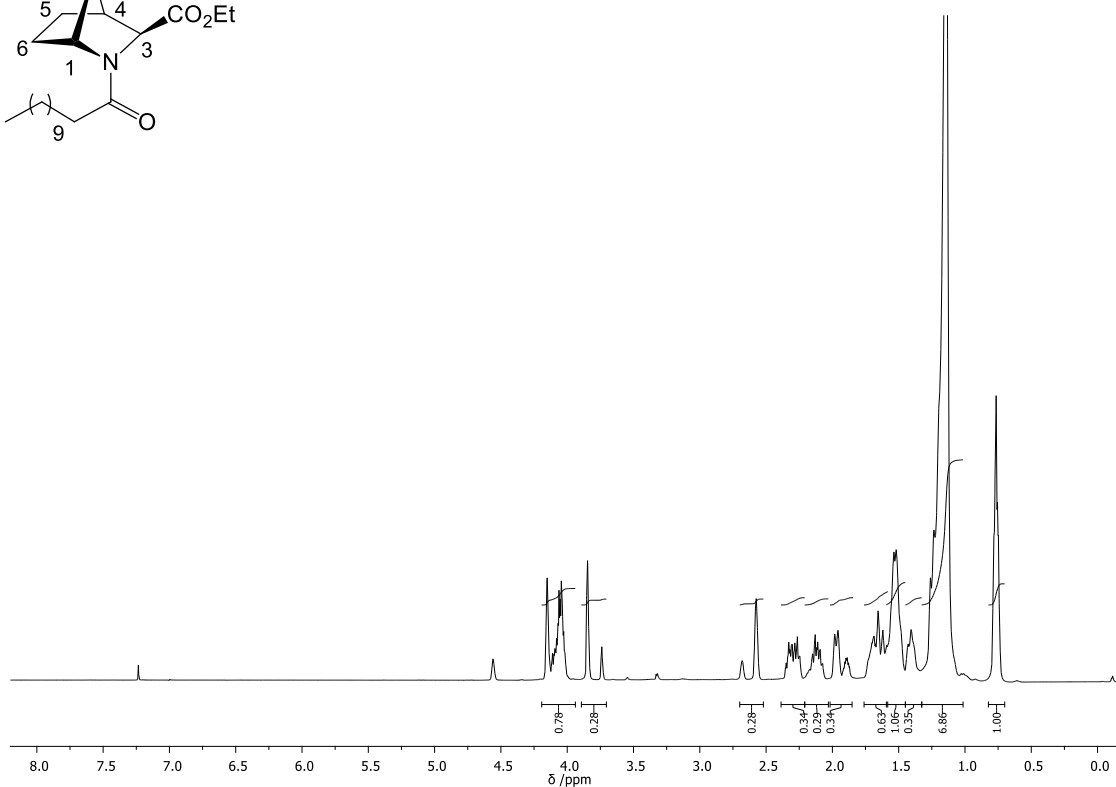
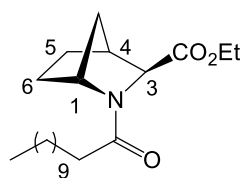
R_f: 0,71 em AcOEt

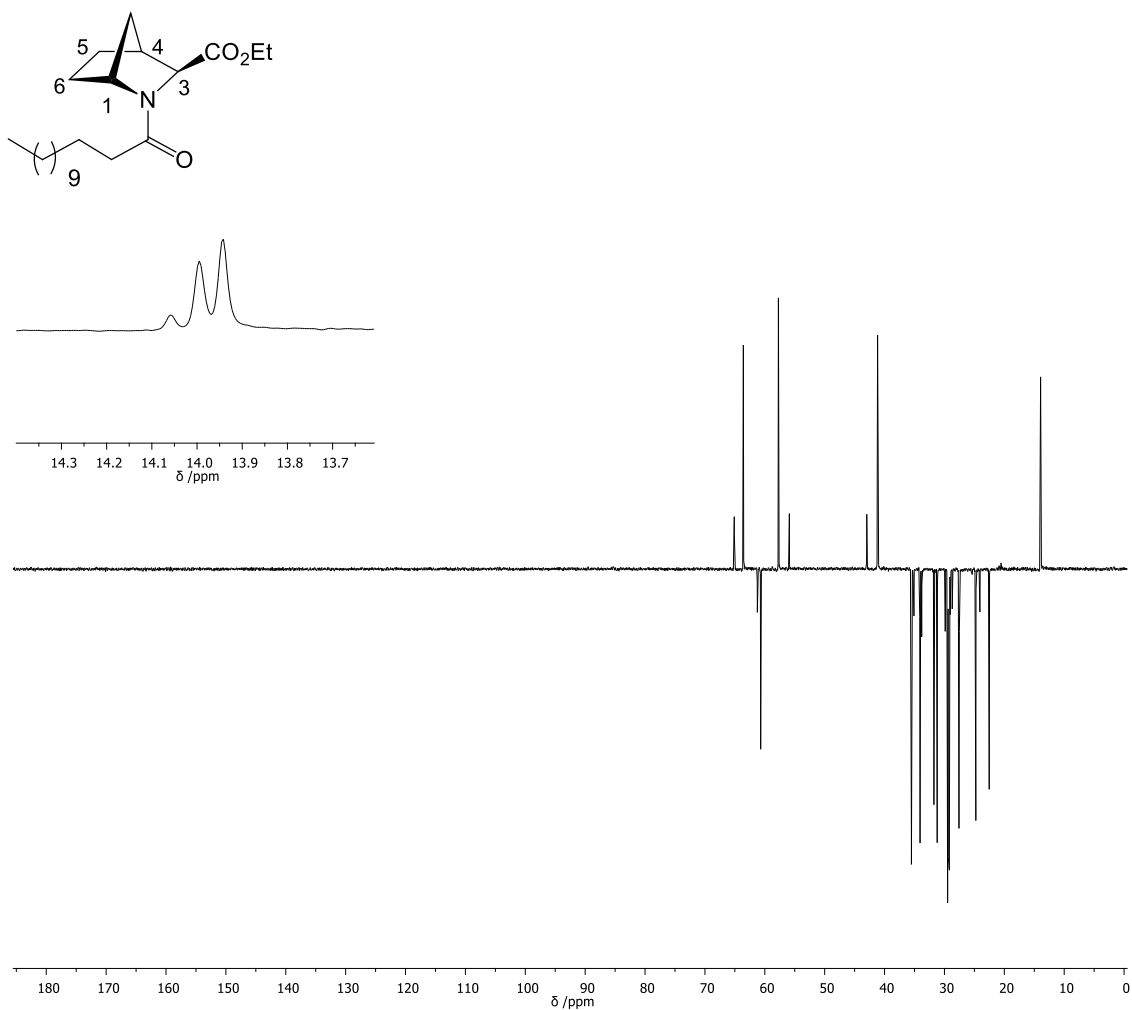
[α]_D²⁴ = – 103 (c1, MeOH)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,15 (s, 1H, H-1); 4,11 – 3,91 (m, 2H, COOCH₂); 3,79 (d, *J* = 43,0 Hz, 1H, H-3); 2,63 (d, *J* = 41,9 Hz, 1H, H-4); 2,37–2,20 (m, 1H); 2,20 – 2,01 (m, 1H); 2,01–1,80 (m, 1H); 1,66 (m, 2H); 1,55 (t, *J* = 14,2 Hz, 4H); 1,39 (m, 1H); 1,25 – 1,02 (m, 22H, (CH₂)₈ + COOCH₂CH₃); 0,83 – 0,65 (m, 3H, (CH₂)₈CH₃)

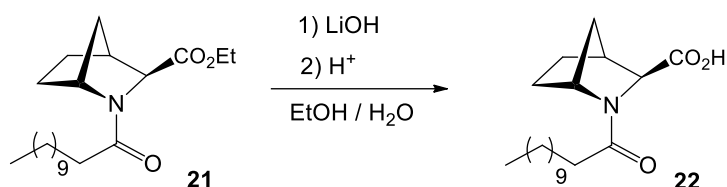
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, CDCl₃) δ: [170,69 (C), 170,14(C), CON + COEt]; 63,59 (CH, C-3); 60,69 (CH₂, COCH₂CH₃); 57,62 – 56,45 (CH, C-1); 41,17 (CH, C-4); 14,75 – 13,36 (CH₃, (CH₂)₈CH₃ + COCH₂CH₃)

EM (ESI): *m/z* calculado para [M]⁺ 366,29, obtido 366,30





4.3.2 Síntese de ácido (1R,3S,4S)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carboxílico



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **12w** (seção 4.3.4.), procedeu-se á hidrólise do composto **21** (0,490 g; 1,39 mmol) ao fazer-lo reagir com LiOH (0,200 g; 8,34 mmol; 6 eq) durante 5h. Posteriormente realizou-se o tratamento corrente e obteve-se um óleo amarelo (**22**) (0,350 g). O rendimento da reação foi 77,2 %.

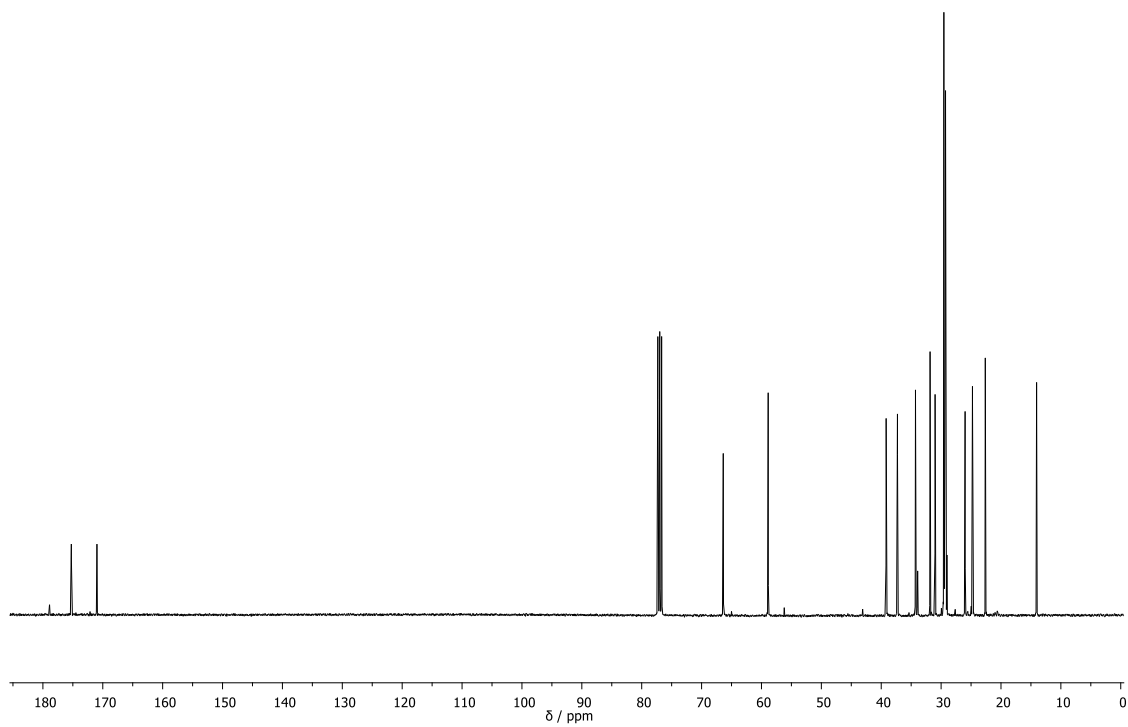
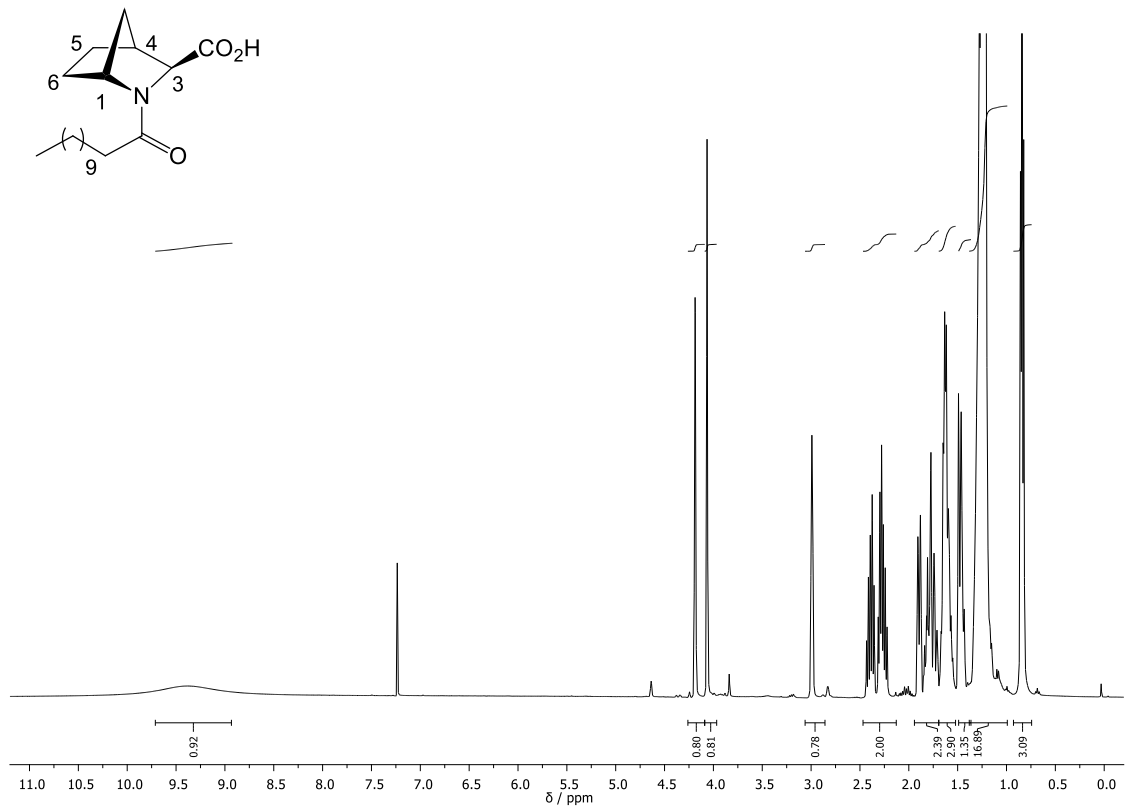
Composto: óleo amarelo

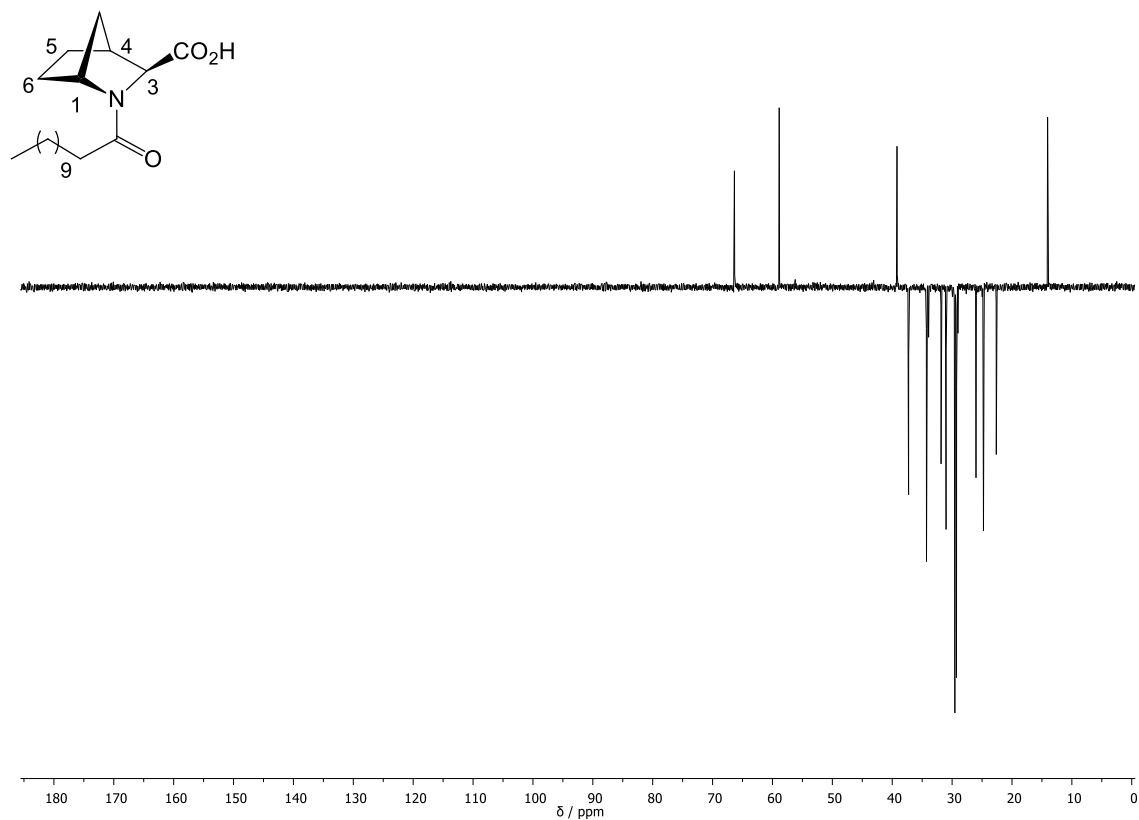
$[\alpha]_D^{24} = -151$ (c1, MeOH)

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 9,38 (s, 1H, COOH); 4,19 (s, 1H, H-1); 4,06 (s, 1H, H-3); 2,99 (s, 1H, H-4); 2,46–2,13 (m, 2H); 1,91–1,68 (m, 2H); 1,60 (m, 3H); 1,53–1,38 (m, 1H); 1,38–0,99 (m, 16H, $(\text{CH}_2)_8$); 0,84 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)

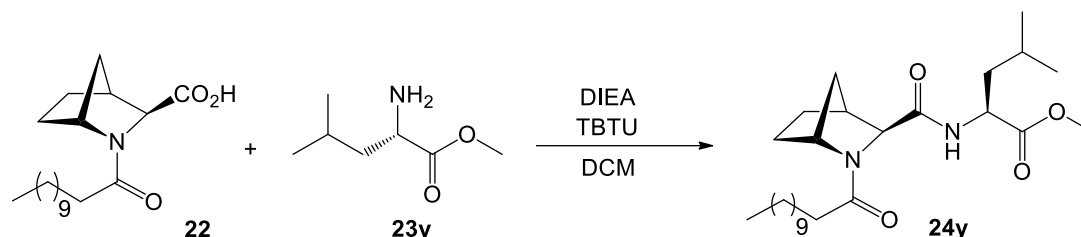
^{13}C -RMN e DEPT (100 MHz, CDCl_3) δ : [175,25 (C), 170,97 (C), COOH+ CON]; 66,35 (CH, C-3); 58,87 (CH, C-1); 39,20 (CH, C-4); 14,05 (CH_3 , $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)

EM (ESI): m/z calculado para $[\text{M}]^-$ 336,26, obtido 336,27





4.3.3 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucinato de metilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o composto **22** (0,150 g; 0,460 mmol) e a leucina esterificada (**23y**) (0,125 g, 0,690 mmol, 1.5 eq.) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**24y**) (0,165 g). O rendimento da reação foi de 77,2 %.

Composto: óleo amarelado

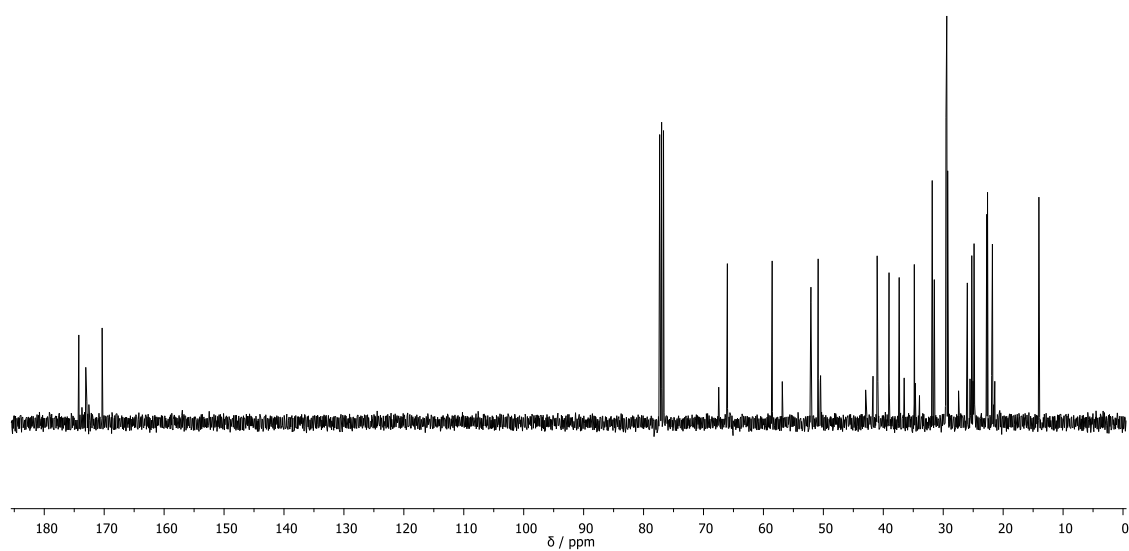
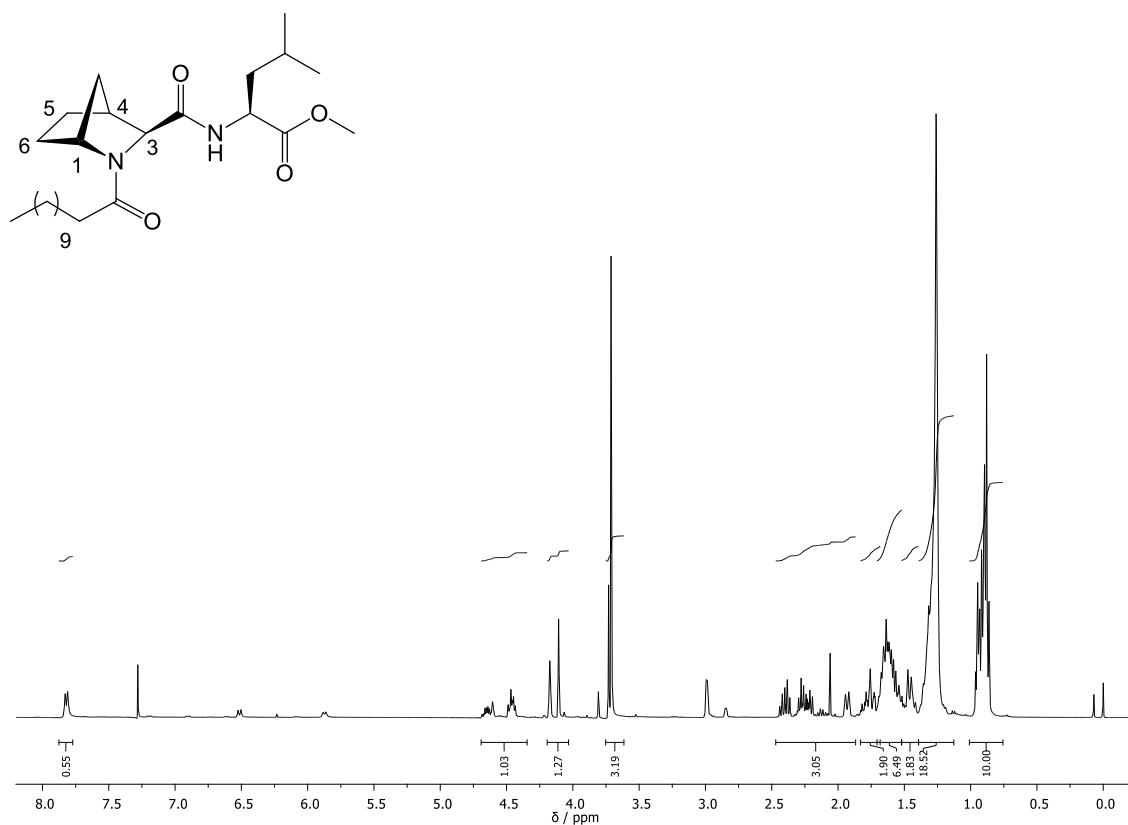
R_f: 0,64 em AcOEt

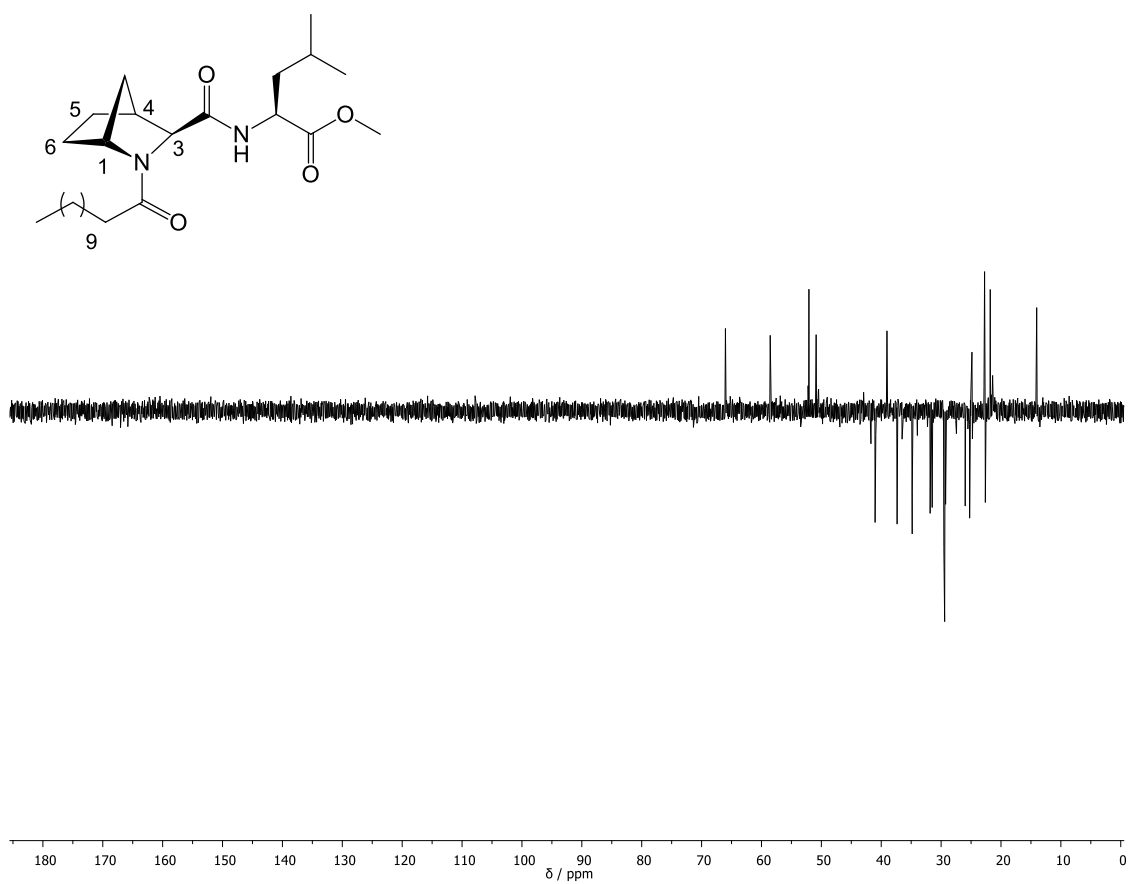
[α]_D²⁴ = – 76 (c1, MeOH)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,82 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, CONH); 4,72–4,38 (m, 1H, H_{Leu}-2); 4,12 (t, *J* = 21,5 Hz, 1H, H-3); 3,73 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H, H-1); 3,71 (s, 3H, CO₂CH₃); 3,00 – 2,78 (m, 1H, H-4); 2,45–2,13 (m, 2H); 1,97–1,86 (m, 1H); 1,96–1,86 (m, 1H); 1,83–1,68 (m, 2H); 1,70–1,46 (m, 7H); 1,47–1,40 (m, 2H); 1,38 – 1,13 (m, 16H, (CH₂)₈); 0,98–0,81 (m, 9H, (CH₂)₈CH₃ + H_{Leu}-5)

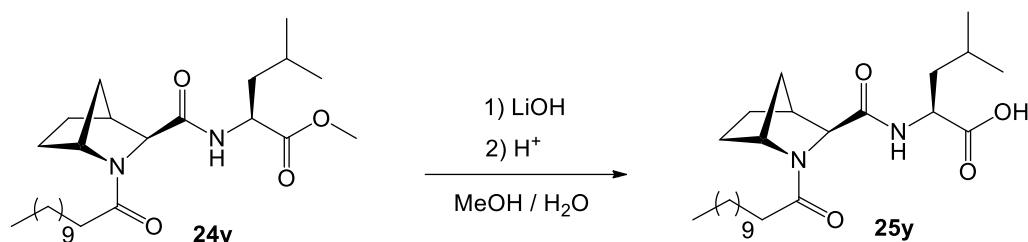
¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: [174,24 (C), 173,07 (C), 170,34 (C), CONH + CONH, COOEt]; 66,02 (CH, C-3); 58,54 (CH, C-1); 52,08 (CH₃, CO₂CH₃); 39,04 (CH, C-4); 24,85 (CH, C_{Leu}-2); 22,74 (CH, C_{Leu}-4); 21,79 (CH₃, C_{Leu}-5); 14,04 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 465,36, obtido 465,38





4.3.4 Síntese **[(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucina**



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **10w** (secção 4.3.2.), procedeu-se á hidrólise do composto **24y** (0,400 g; 0,88 mmol) utilizando LiOH durante 4h e, posteriormente, realizou-se o tratamento corrente. Obteve-se um composto branco (**25y**) (0,300 g) e o rendimento da reação foi de 78,1 %.

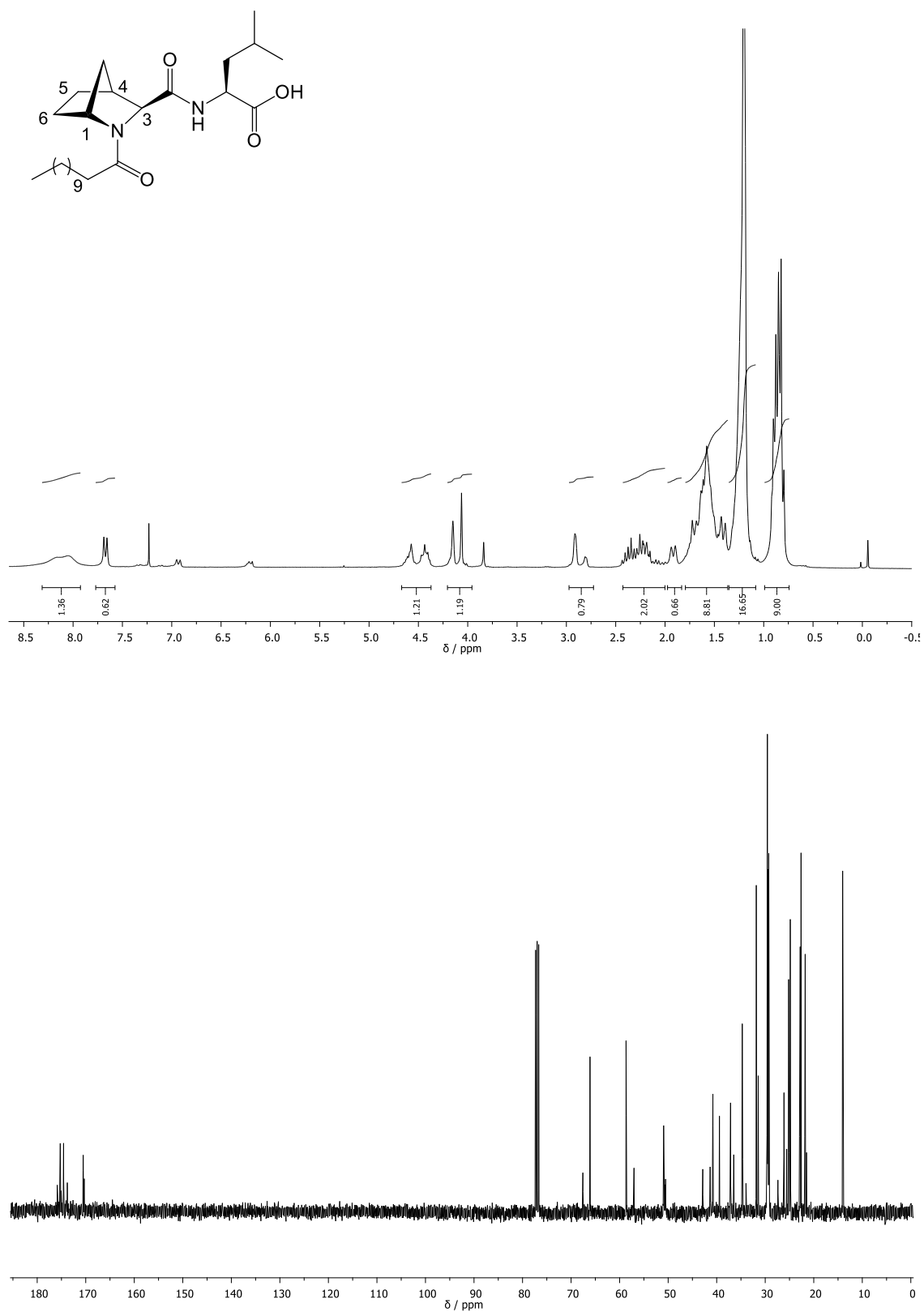
Composto: óleo amarelado

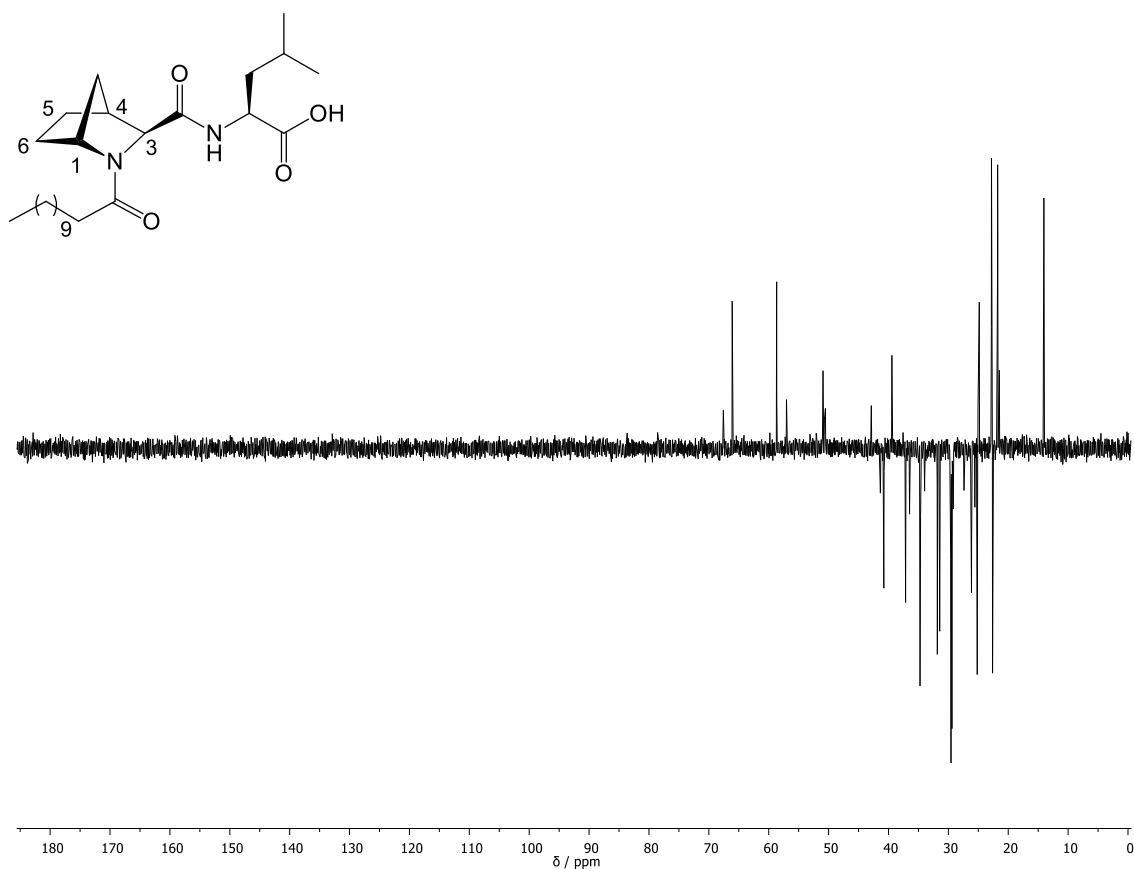
$$[\alpha]_D^{24} = -82 \text{ (c1, MeOH)}$$

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,06 (s, 1H, CO₂H); 7,67 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, CONH); 4,57 (dd, *J* = 15,3, 11,2 Hz, 1H, H-3); 4,44 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, H_{Leu}-2); 4,08 (t, *J* = 17,2 Hz, 1H, H-1); 2,86 (d, *J* = 26,1 Hz, 1H, H-4); 2,46 – 1,98 (m, 2H); 1,97 – 1,80 (m, 1H); 1,80 – 1,35 (m, 9H); 1,17 (m, 16H, (CH₂)₈); 1,00 – 0,71 (m, 9H(CH₂)₈CH₃ + H_{Leu}-5)

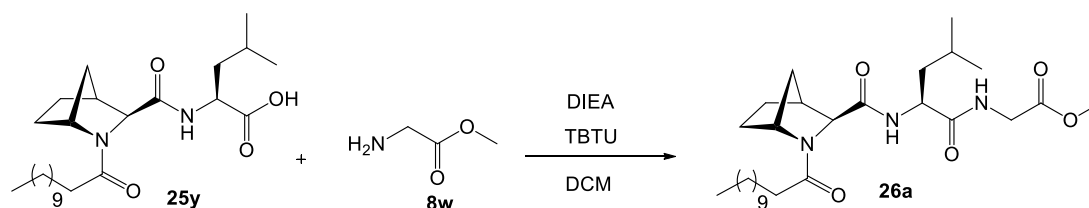
¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: [175,25 (C), 174,57 (C), 170,53 (C), CON + CONH + COOH], 66,10 (CH, C-3); 58,68 (CH, C-1); 39,43 (CH, C-4); 24,83 (CH, C_{Leu}-2); 22,87 (CH, C_{Leu}-4); 21,70 (CH₃, C_{Leu}-5); 14,05 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁻ 435,33, obtido 435,34





4.3.1 Síntese de de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucilglicina



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o dipéptido **25y** (0,090 g; 0,206 mmol) e a glicina esterificada (**8w**) (0,040 g, 0,310 mmol, 1.5 eq.) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**26a**) (0,073 g). O rendimento da reação foi de 70,0%.

Composto: óleo amarelado

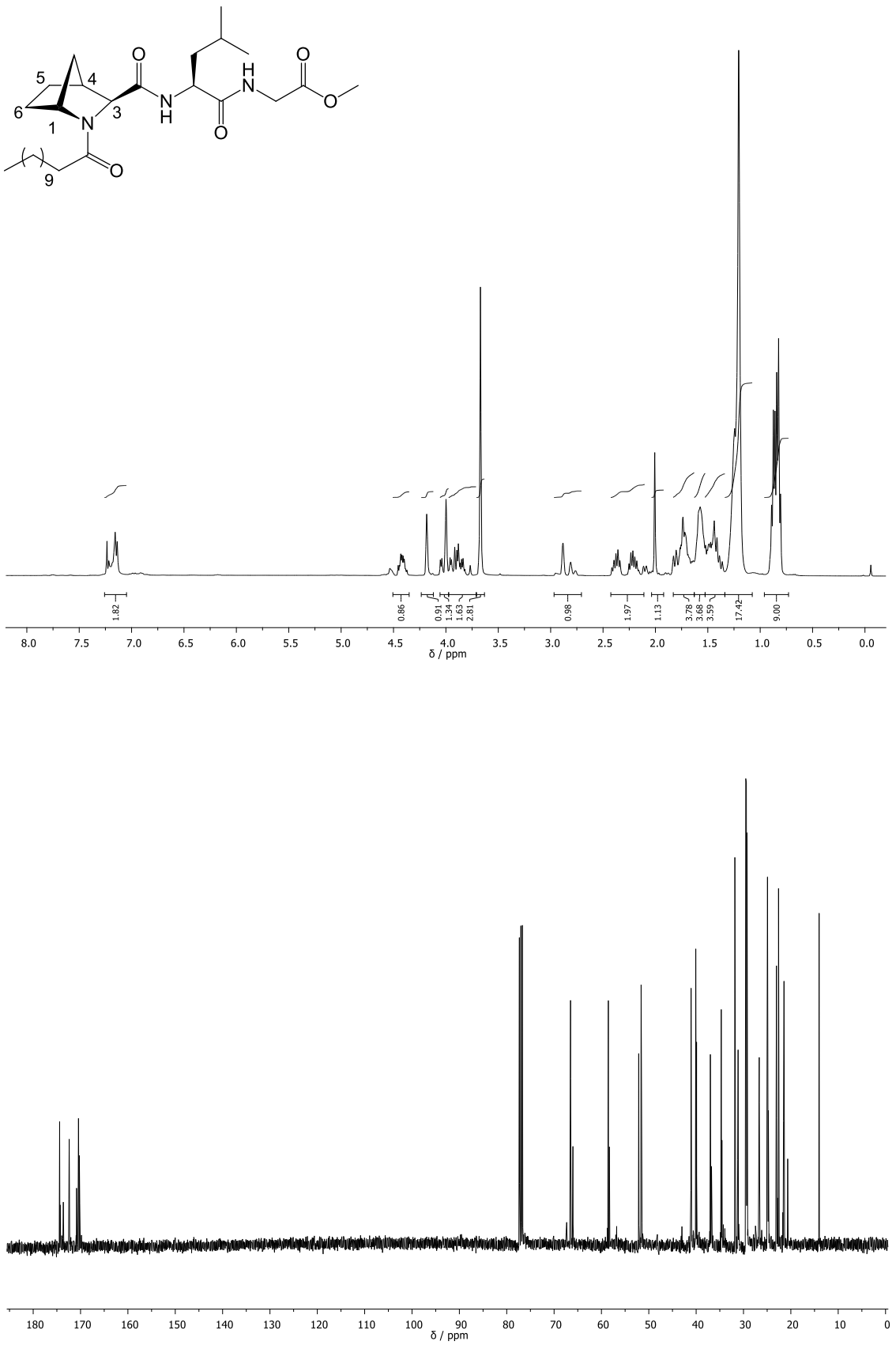
R_f: 0,51 em AcOEt

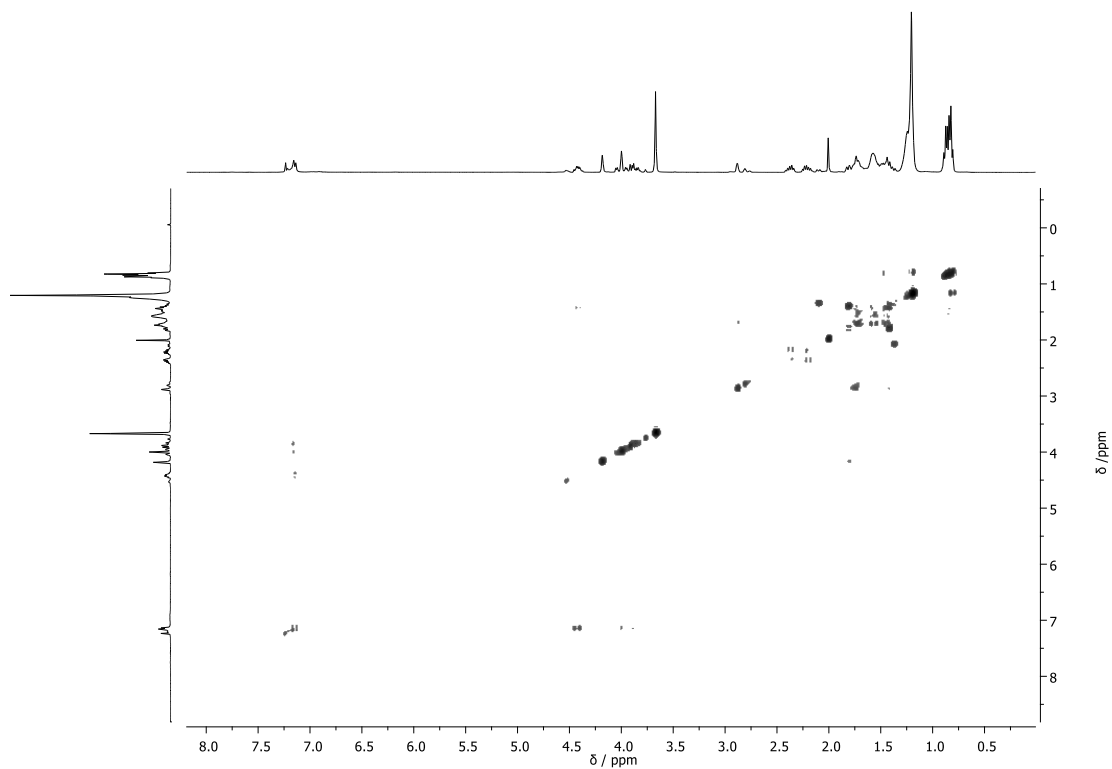
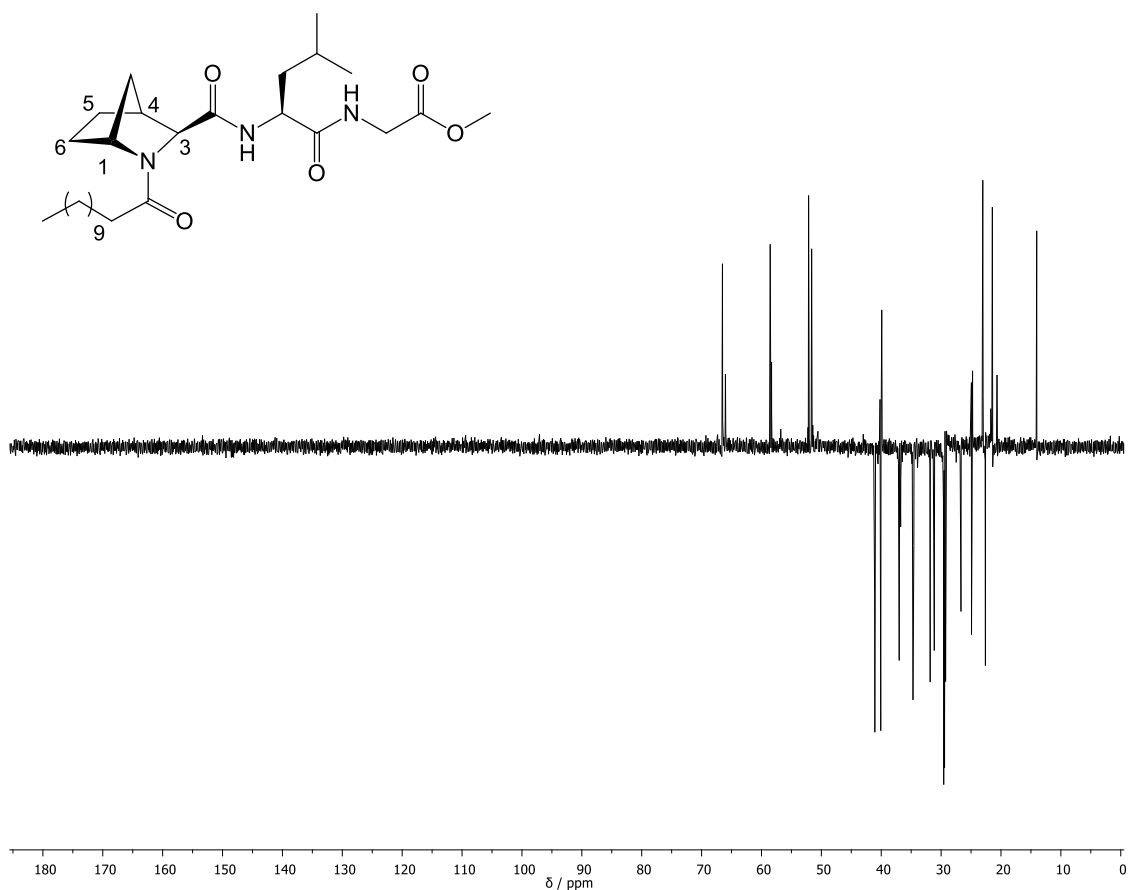
[α]_D²⁴ = – 111 (c1, MeOH)

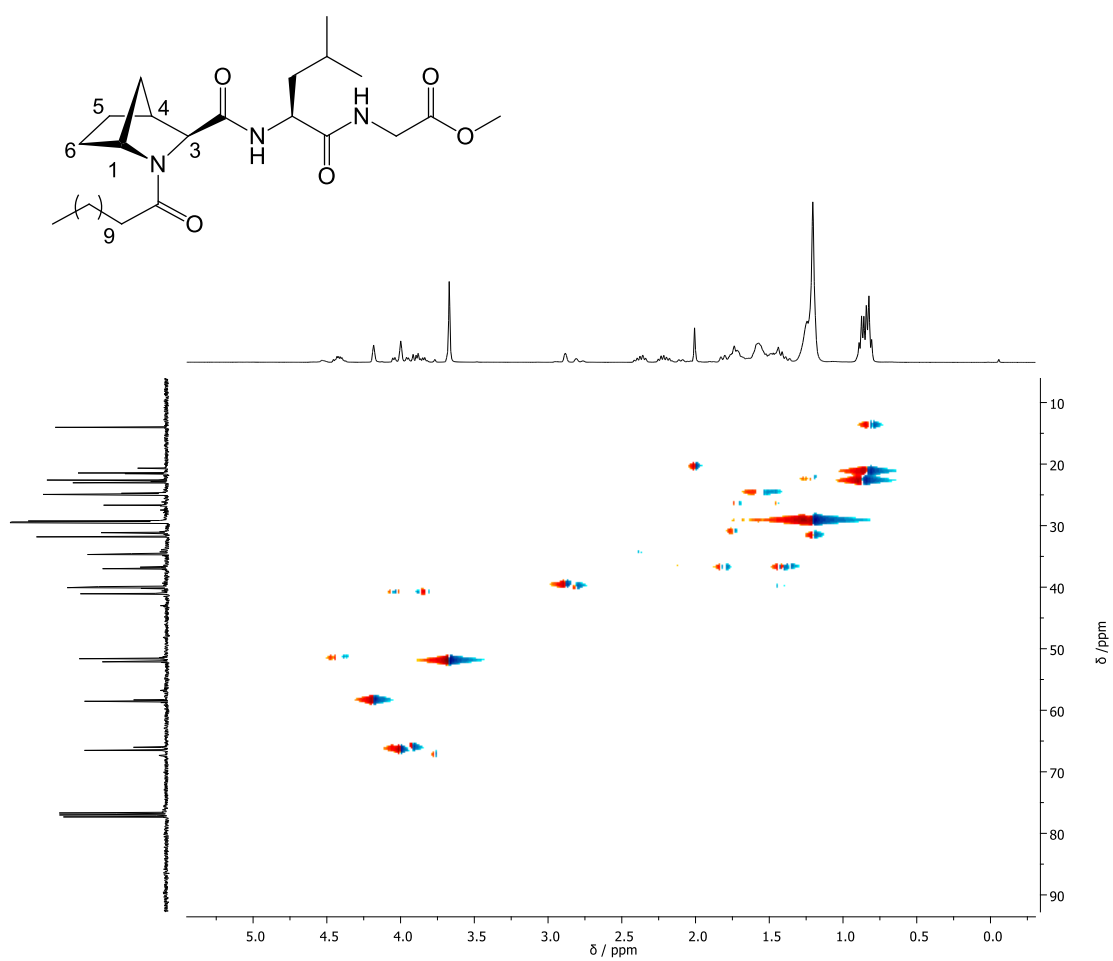
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,27 – 7,05 (m, 2H, 2xCONH); 4,41 (m, 1H, H_{Leu}-2); 4,15 (d, J = 22,5 Hz, 1H, H-1); 4,07–3,97 (m, 1H, H-3); 3,97–3,74 (m, 2H, H_{Gly}-2); 3,67 (s, 3H, CO₂CH₃); 2,95–2,67 (m, 1H, H-4); 2,41–2,04 (m, 2H); 2,02 (d, J = 9,7 Hz, 1H); 1,85–1,63 (m, 4H); 1,65–1,49 (m, 4H); 1,51–1,33 (m, 4H); 1,22 (m, 18H, (CH₂)₈); 0,85 (m, 9H, (CH₂)₈CH₃ + H_{Leu}-5)

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: [174,42 (C), 172,43 (C), 170,43 (C), 170,25 (C), CON + CONH + COOEt], 66,27 (CH, C-3); 58,43 (CH, C-1); 52,11 (CH₃, COOCH₃); 51,62 (CH, C_{Leu}-2); 40,08 (CH₂, C_{Gly}-2); 39,91 (CH, C-4); 21,80–21,18 (CH, C_{Leu}-4); 21,70 (CH₃, C_{Leu}-5); 14,05 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

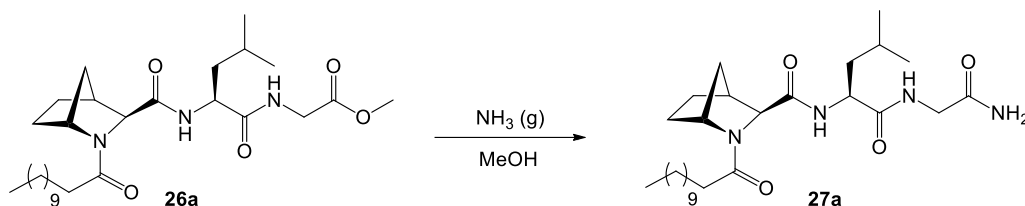
EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 508,37, obtido 508,37







4.3.2 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucilglicinamida



Dissolveu-se o tripéptido **26a** (0,020 g; 0,0394 mmol) em MeOH e arrefeceu-se a mistura usando um banho de gelo. Fez-se passar uma corrente de NH₃ (g) na mistura reacional e esta manteve-se em agitação á temperatura ambiente durante 4h.

Posteriormente, eliminou-se o solvente por pressão reduzida e para eliminar o excesso de NH₃ coevaporou-se com DCM (3 × 10 mL). No final obteve-se um óleo amarelado (**27a**) (0,014 g) e o rendimento da reação foi de 69,0%.

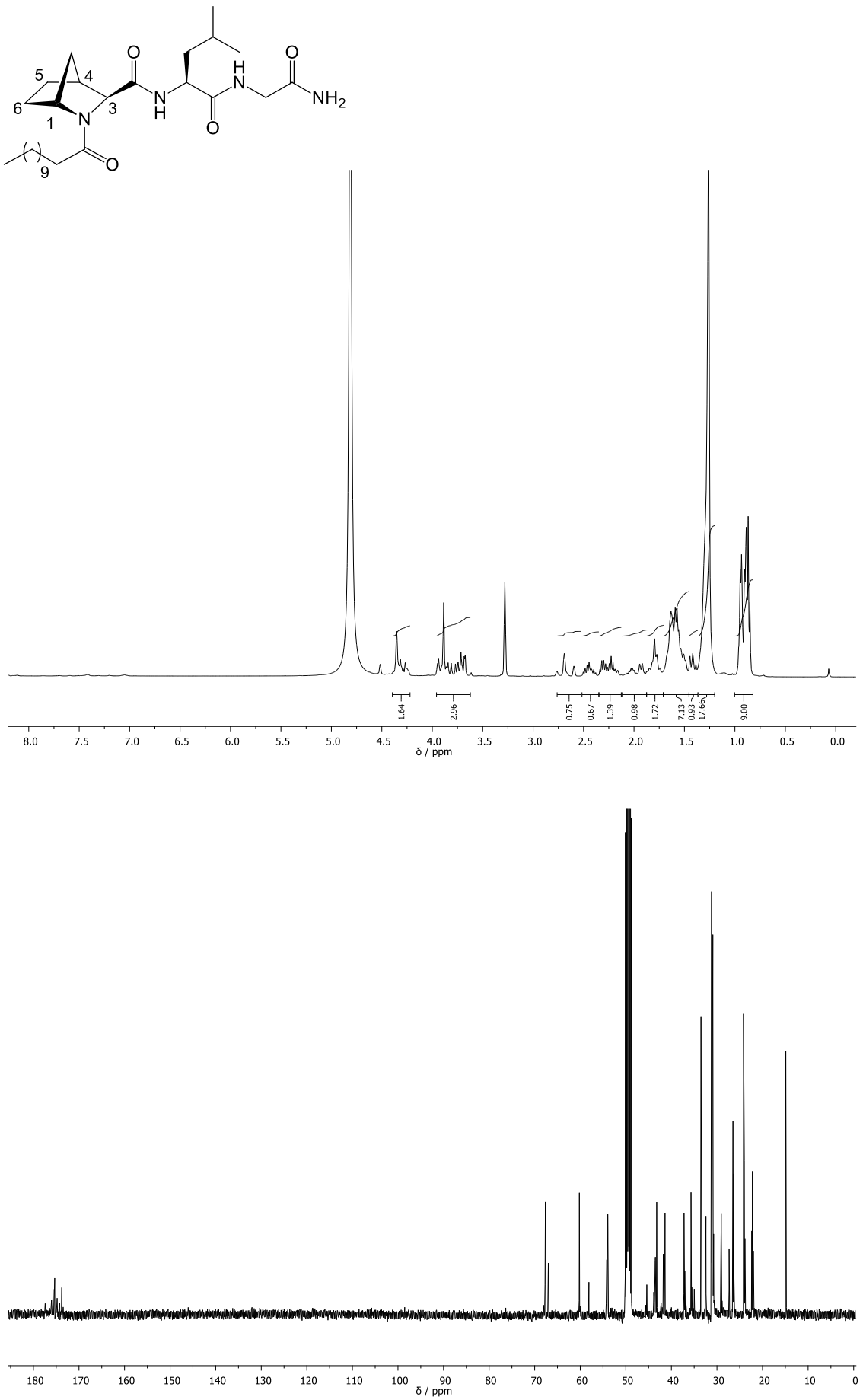
Composto: óleo amarelado

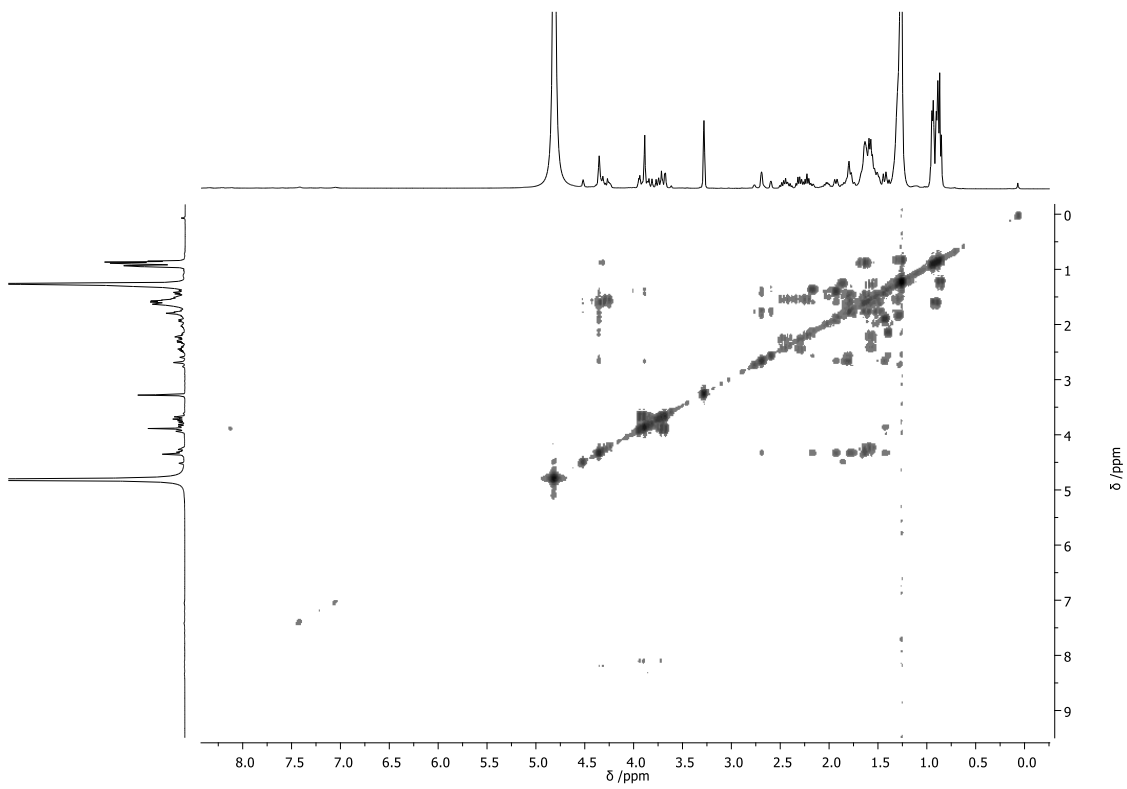
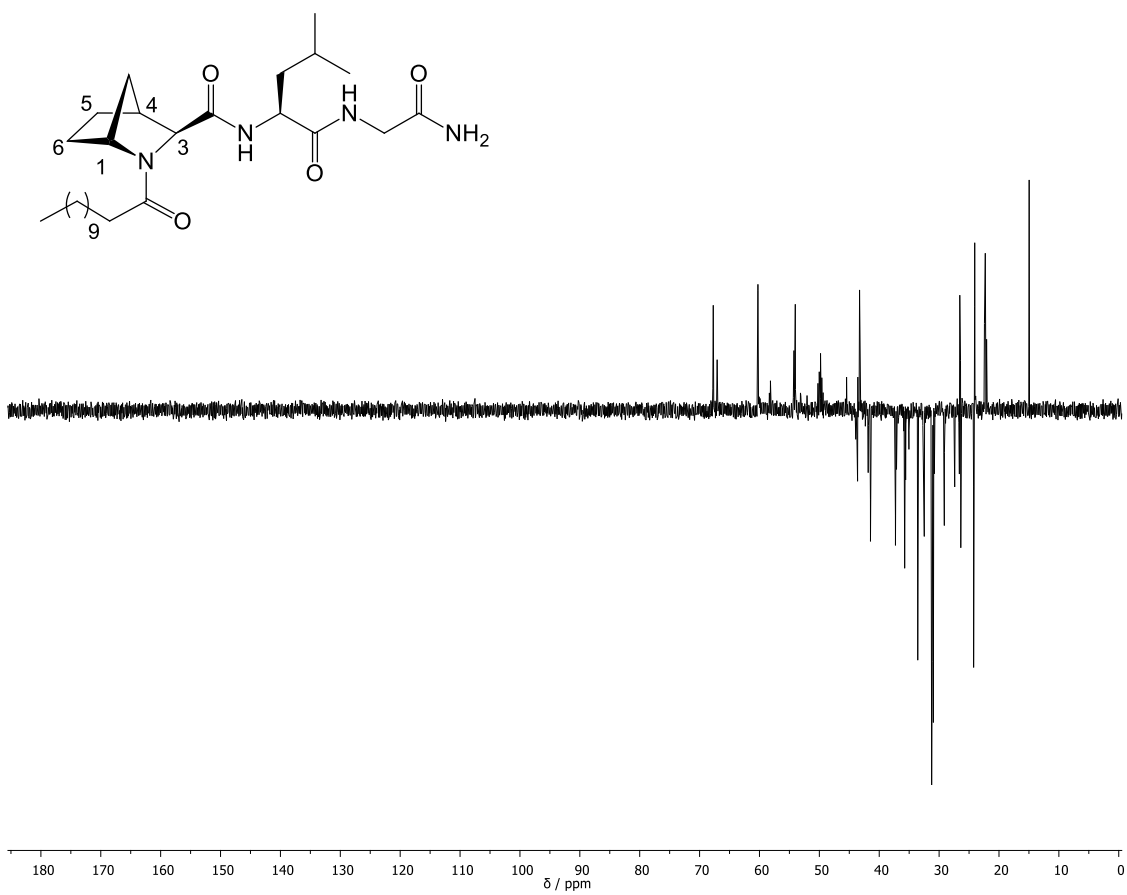
$$[\alpha]_D^{24} = -55 \text{ (} c1, \text{ MeOH)}$$

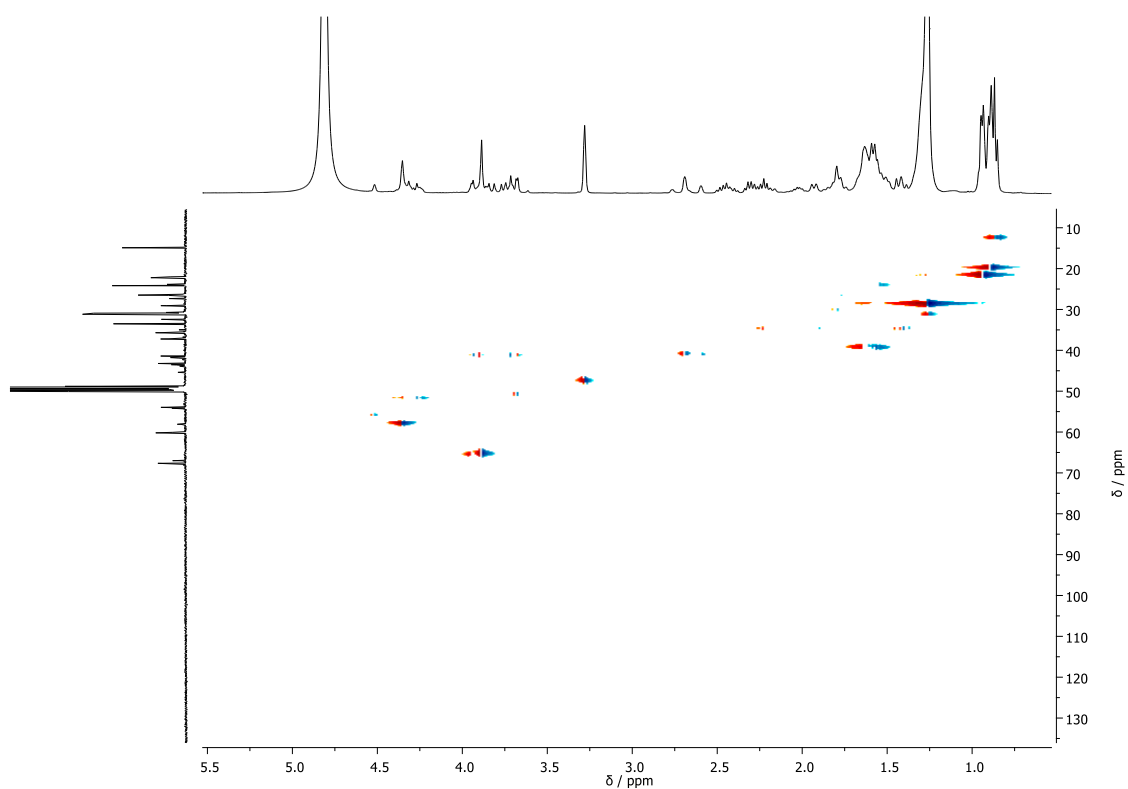
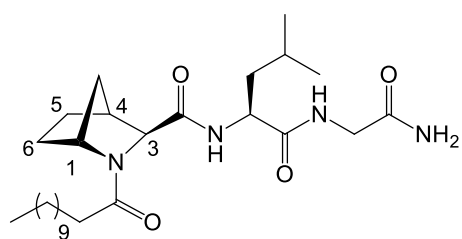
¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ: 4,40 – 4,20 (m, 2H, H_{Leu}-2 + H-1); 3,97 – 3,59 (m, 3H, H_{Gly}-2 + H-3); 2,81 – 2,52 (m, 1H, H-4); 2,52 – 2,34 (m, 1H); 2,34 – 2,13 (m, 1H); 2,10 – 1,86 (m, 1H); 1,86 – 1,71 (m, 2H); 1,71 – 1,46 (m, 7H); 1,40 (dd, *J* = 24,2, 11,9 Hz, 1H); 1,26 (s, 16H, (CH₂)₈); 0,98 – 0,76 (m, 9H, (CH₂)₈CH₃ + H_{Leu}-5)

¹³C-RMN (100 MHz, MeOD) δ: [175,75–175,60 (C), 175,32 (C), 174,95–174,75 (C), 173,77 (C), CONH + CON + CONH₂], 67,39 (CH, C-3); 60,19 (CH, C-1); 54,62 – 53,17 (CH, C_{Leu}-2); 43,77 (CH₂, C_{Gly}-2); 43,28 (CH, C-4); 26,40 (CH, C_{Leu}-4); 23,66 – 22,07 (CH₃, C_{Leu}-5); 14,96 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

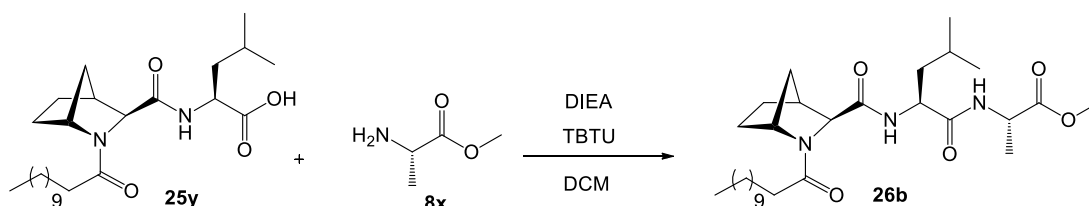
EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 491,37, obtido 491,36







4.3.3 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucil-L-alaninato de metilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o dipéptido **25y** (0,140 g; 0,320 mmol) e a alanina esterificada (**8x**) (0,0675 g, 0,480 mmol, 1.5 eq.) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etilo. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**26b**) (0,120 g). O rendimento da reação foi de 72,5 %.

Composto: óleo amarelado

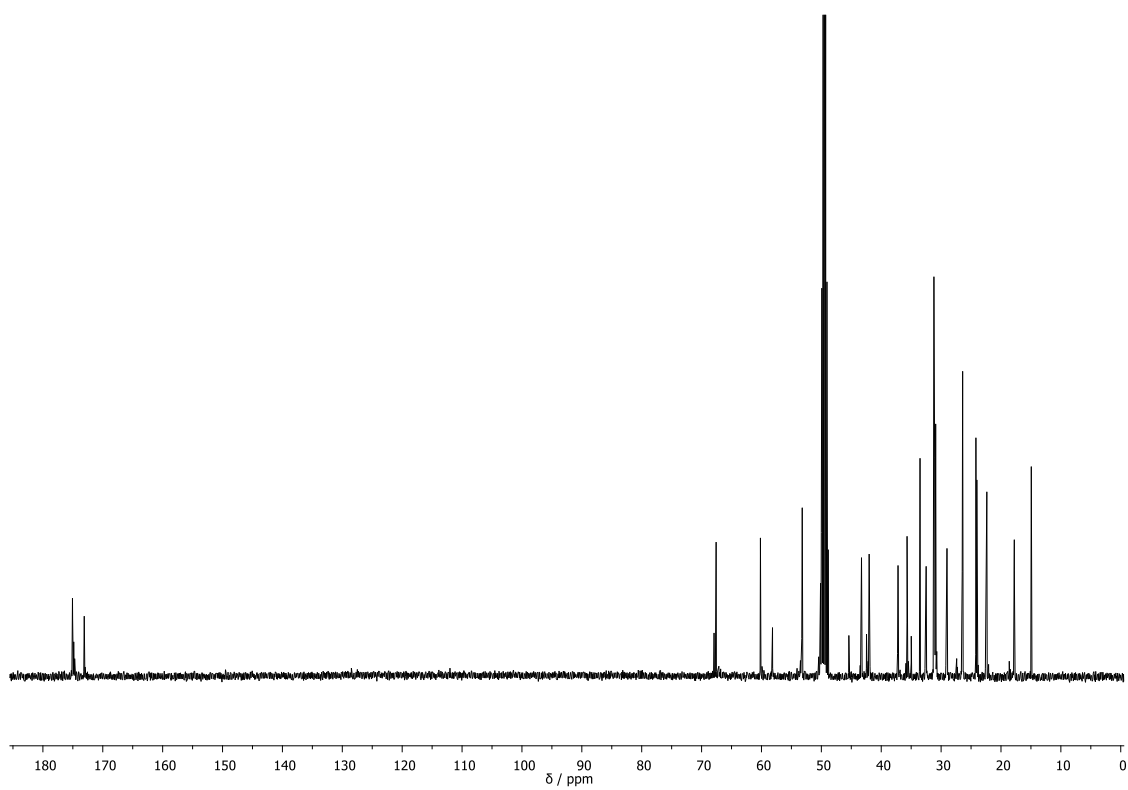
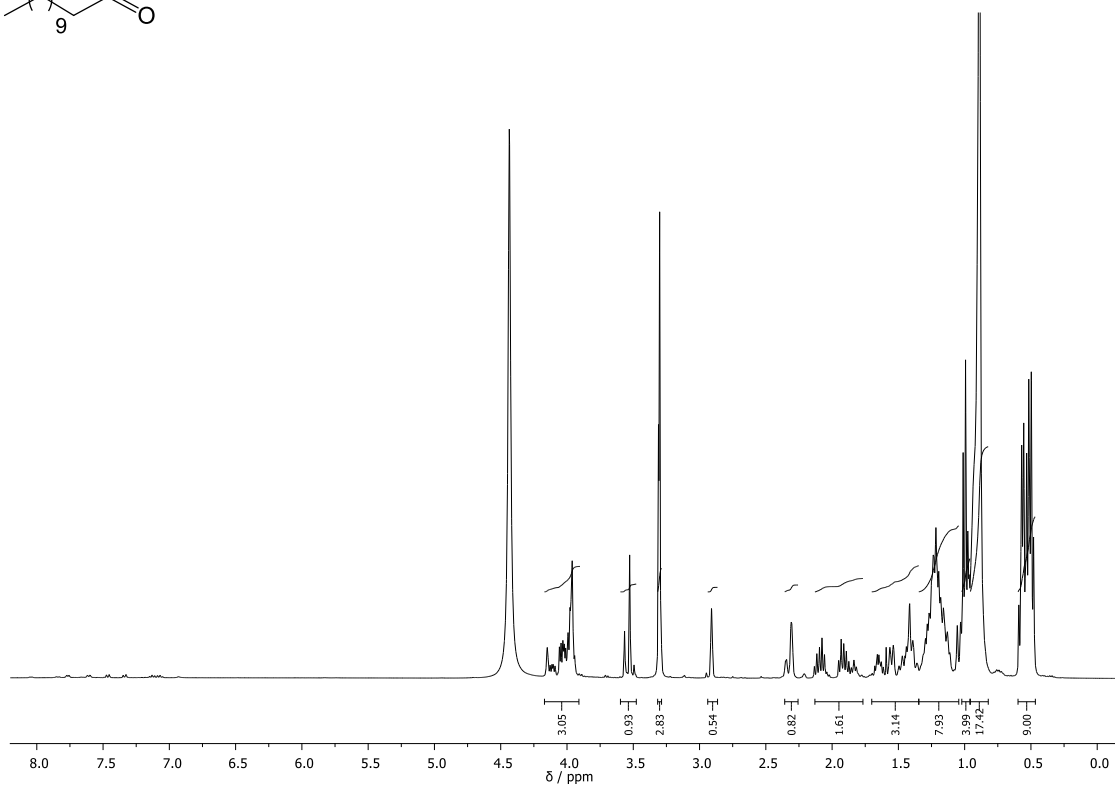
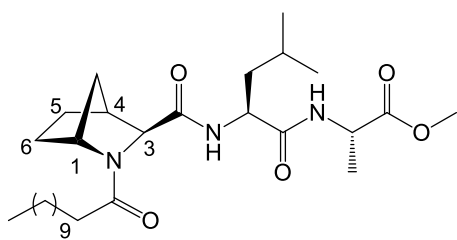
R_f: 0,70 em AcOEt

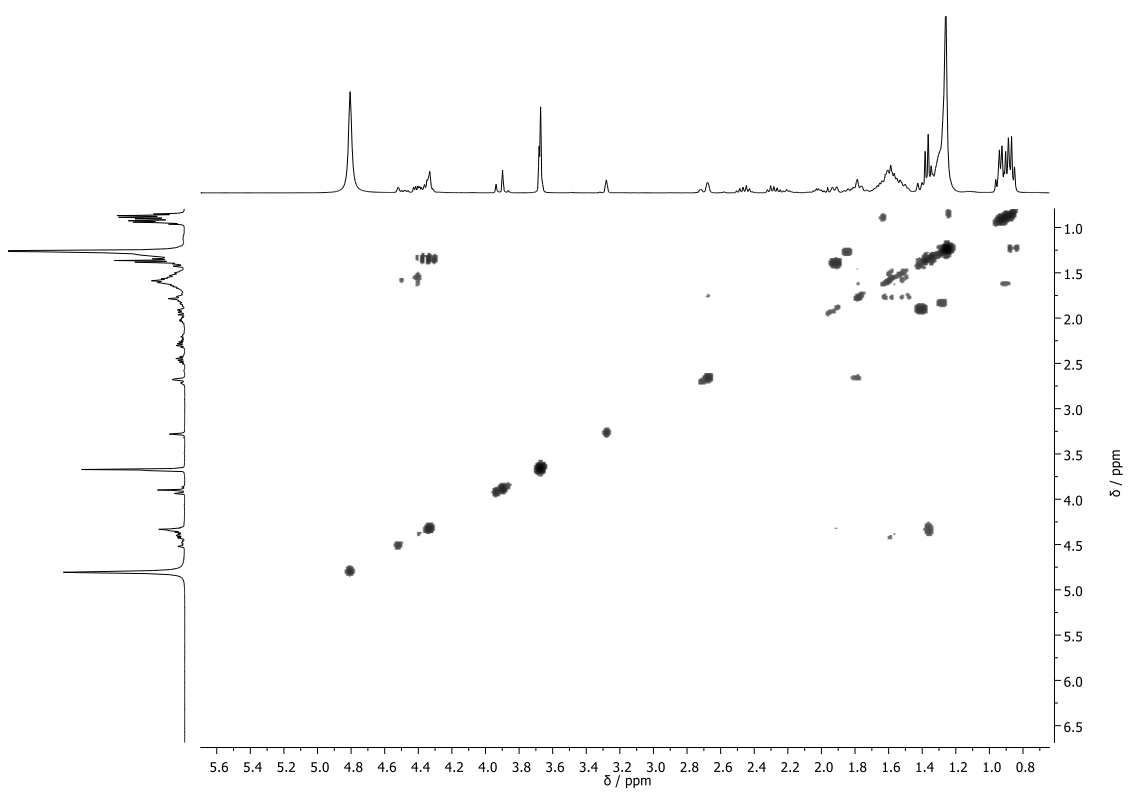
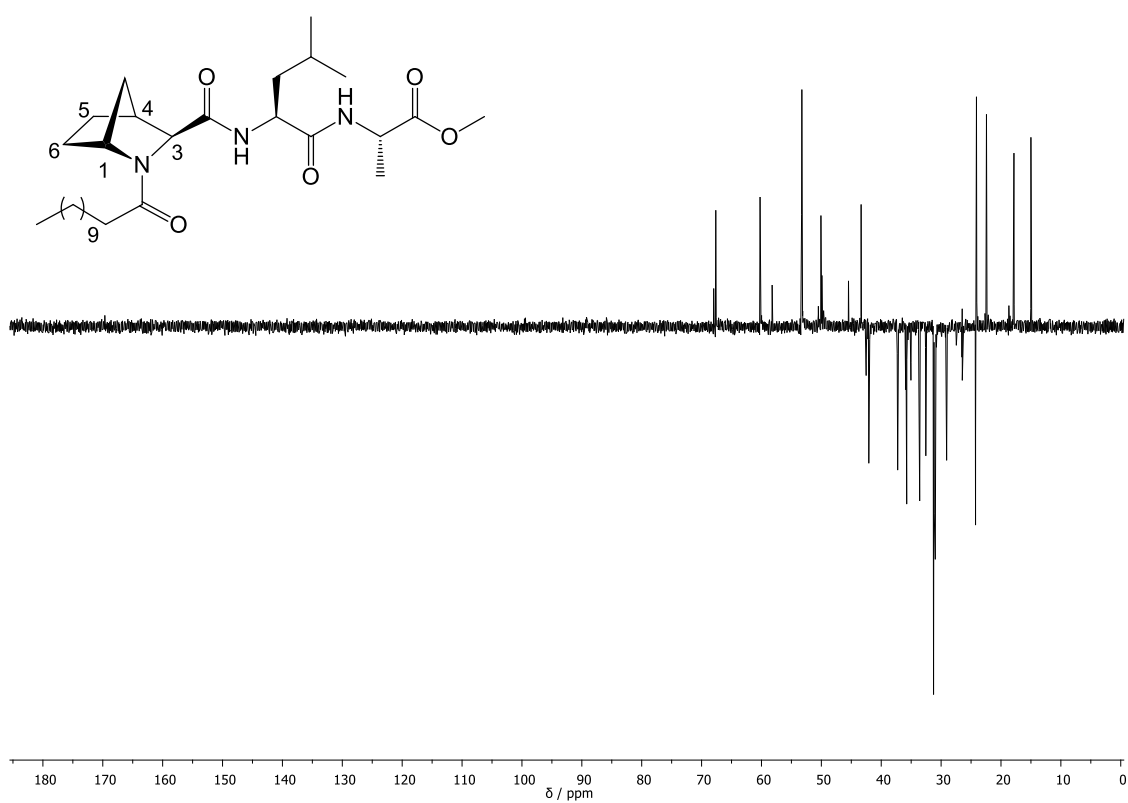
[α]_D²⁴ = – 60 (c1, MeOH)

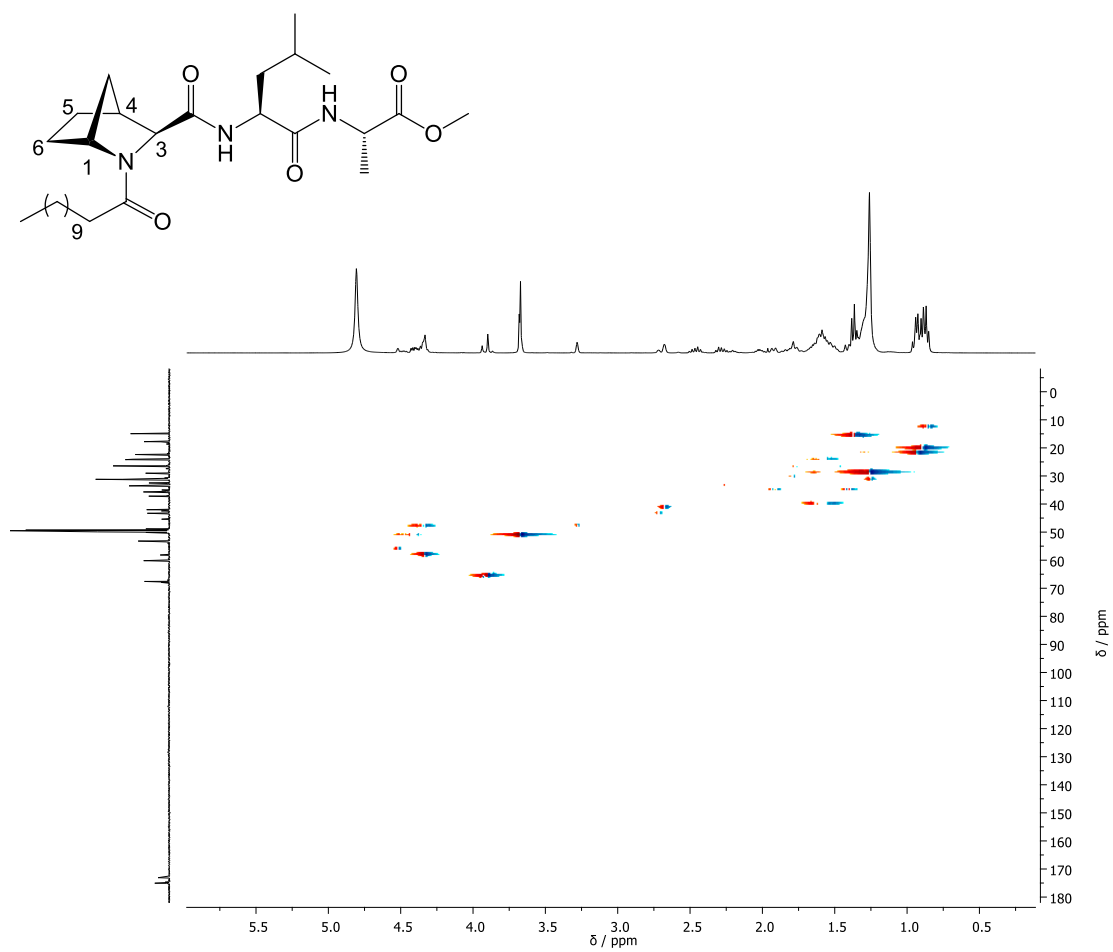
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,18–3,91 (m, 3H, H_{Leu}-2 + H_{Ala}-2 + H-1); 3,58–3,47 (m, 1H, H-3); 3,31 (s, 3H, COOCH₃); 2,91 (s, 1H, H-4); 2,36–2,26 (m, 1H); 2,14–1,75 (m, 2H); 1,70–1,34 (m, 3H); 1,34–1,08 (m, 8H); 1,03–0,95 (m, 4H, H_{Ala}-3, 0,89 (s, 18H, (CH₂)₈); 0,60–0,43 (m, 9H, (CH₂)₈CH₃ + H_{Leu}-5)

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: [174,42 (C), 172,43 (C), 170,43 (C), 170,25 (C); CON+ CONH+ COOEt], 67,80 (CH, C-3); 60,23 (CH, C-1); 53,27 (CH₃, COOCH₃); 50,07 (CH, C_{Leu}-2); 49,91 (CH, C_{Ala}-2); 43,36 (CH, C-4) 24,17 (CH, C_{Leu}-4); 22,42 (C_{Leu}-5); 17,87 (C_{Ala}-3) 15,00 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

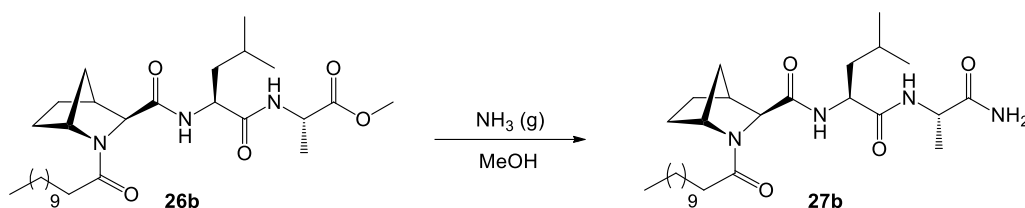
EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 522,38, obtido 522,37







4.3.4 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-leucil-L-alaninamida



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **27a** (secção 4.4.6.), procedeu-se á aminólise do tripéptido **26a** (0,060 g; 0,115 mmol) durante 4h á temperatura ambiente e esta foi controlada por TLC.

Posteriormente, eliminou-se o solvente por pressão reduzida e para eliminar o excesso de NH_3 coevaporou-se com DCM (3×10 mL). No final obteve-se um óleo amarelado (**27b**) (0.046g) e o rendimento da reação foi de 80,0%.

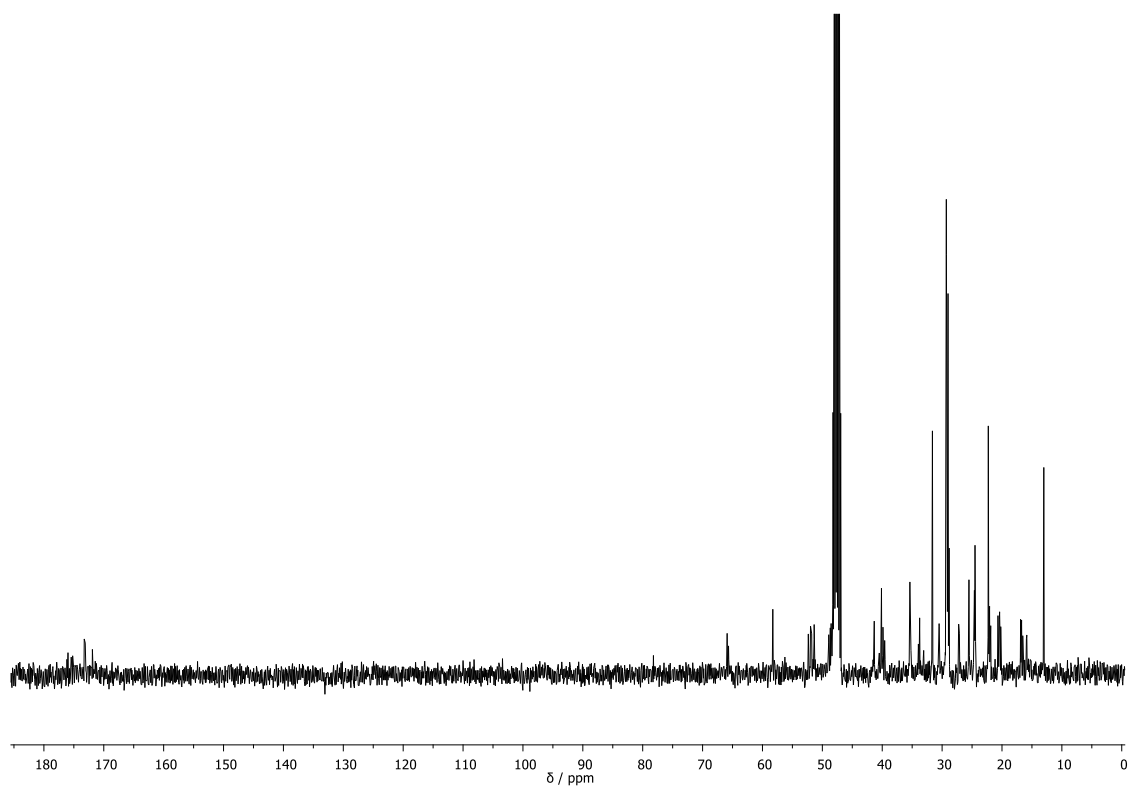
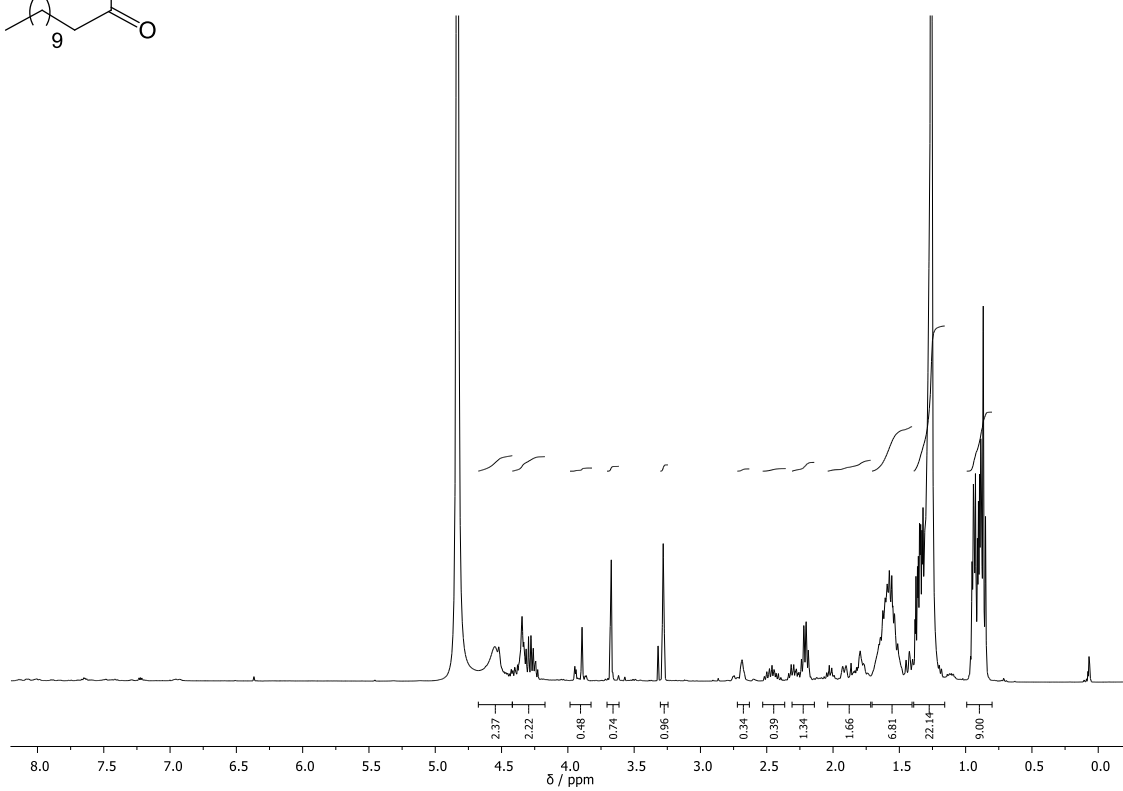
Composto: óleo amarelado

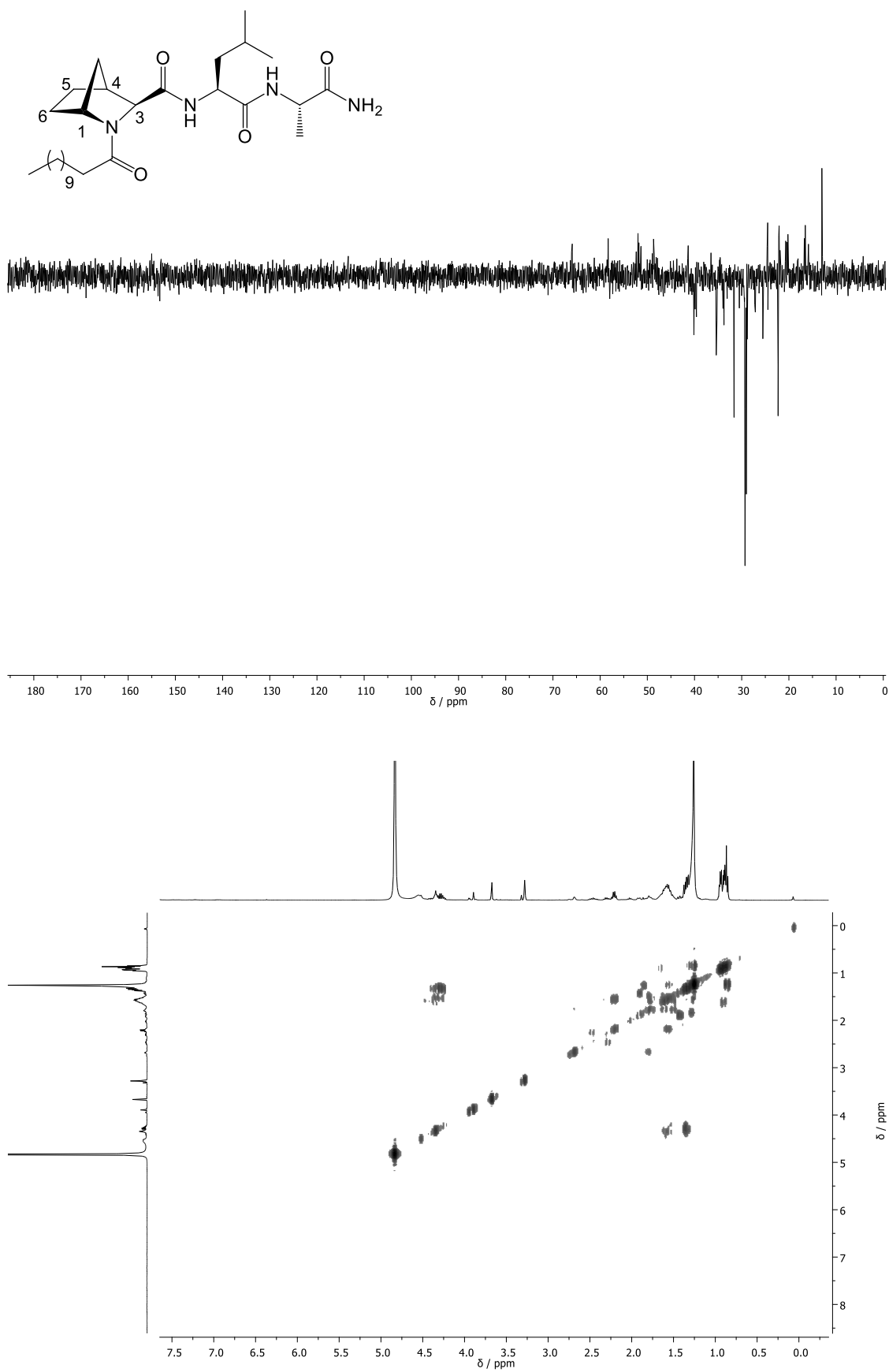
$$[\alpha]_D^{24} = -21,6 \text{ (c1, MeOH)}$$

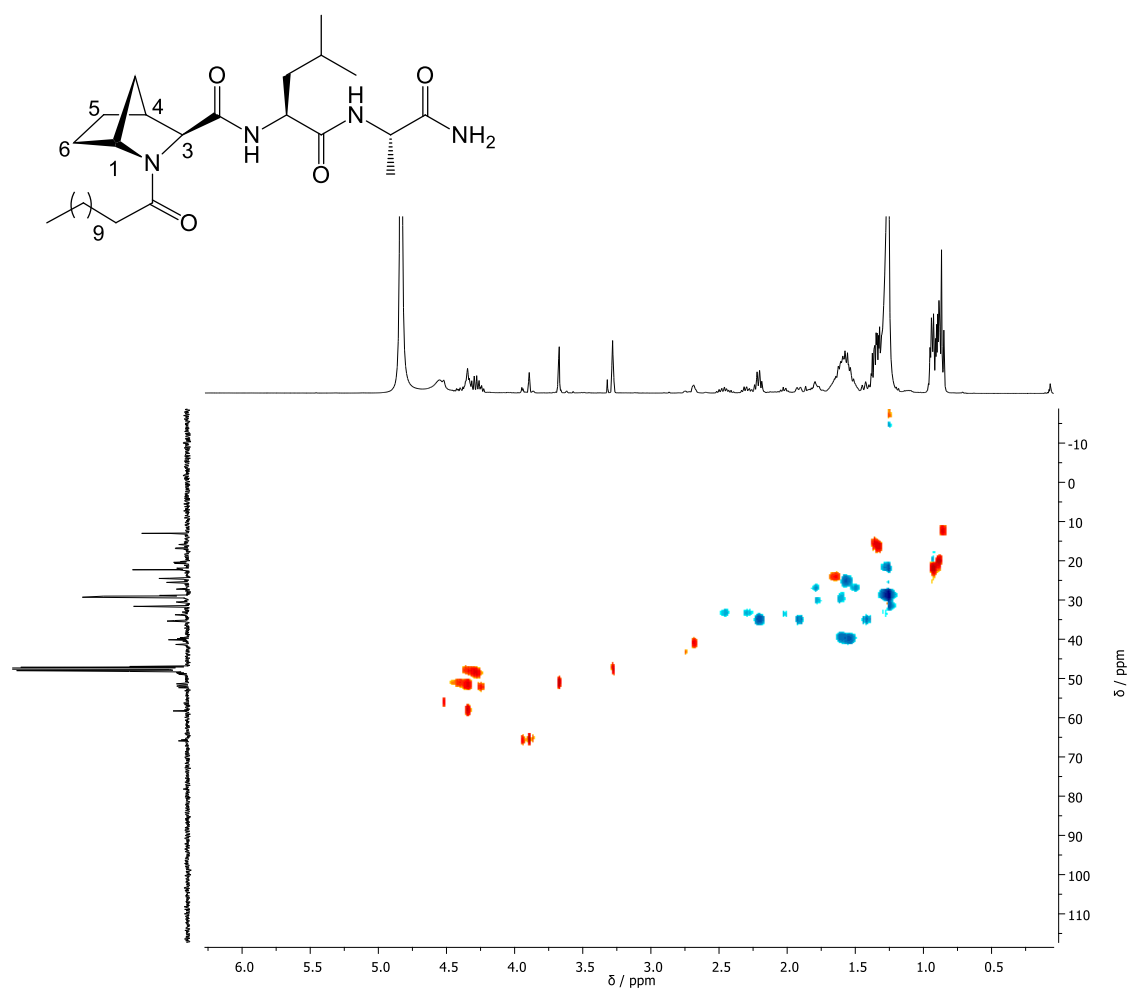
^1H -RMN (400 MHz, MeOD) δ : 4,42–4,19 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Leu-2}} + \text{H-1}$); 3,98–3,82 (m, 1H, $\text{H}_{\text{Ala-2}} + \text{H-3}$); 3,66 (m, 1H, $\text{H}_{\text{Ala-2}} + \text{H-3}$); 2,81–2,57 (m, 1H, H-4); 2,54–2,33 (m, 1H); 2,33–2,14 (m, 2H); 2,05–1,72 (m, 2H); 1,72–1,45 (m, 7H); 1,42–1,30 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Ala-3}}$); 1,28 (d, $J = 19,1$ Hz, 16H, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$); 0,99 – 0,79 (m, 9H, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3 + \text{H}_{\text{Leu-5}}$)

^{13}C -RMN (100 MHz, MeOD) δ : [176,93–175,76 (C), 175,26–174,59 (C), 173,18 (C), 171,90 (C), CON + CONH + CONH₂], 65,91 (CH, C-3); 58,30 (CH, C-1); 52,72–50,83 (CH, $\text{C}_{\text{Leu-2}}$); 48,71–47,32 (CH, $\text{C}_{\text{Ala-2}}$); 41,34 (CH, C-4); 24,47 (CH, $\text{C}_{\text{Leu-4}}$); 20,88–19,43 ($\text{C}_{\text{Leu-5}}$); 17,09–14,98 ($\text{C}_{\text{Ala-3}}$); 13,01 (CH_3 , $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)

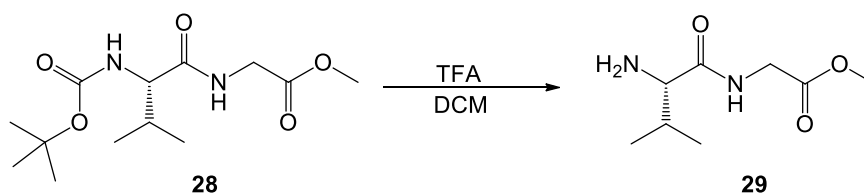
EM (ESI): m/z calculado para $[\text{M}]^-$ 505,38, 505,38







4.3.5 Síntese de L-valilglicinato de metilo



Para um balão dissolveu-se o dipéptido (**28**) (0,250 g; 0,806 mmol) em DCM anidro e colocou-se a mistura reacional num banho de gelo. Posteriormente adicionou-se TFA (2,45 g; 21,5 mmol; 25 eq) e deixou-se a reação em agitação magnética contínua num ambiente inerte durante 2h. Controlou-se a reação por TLC.

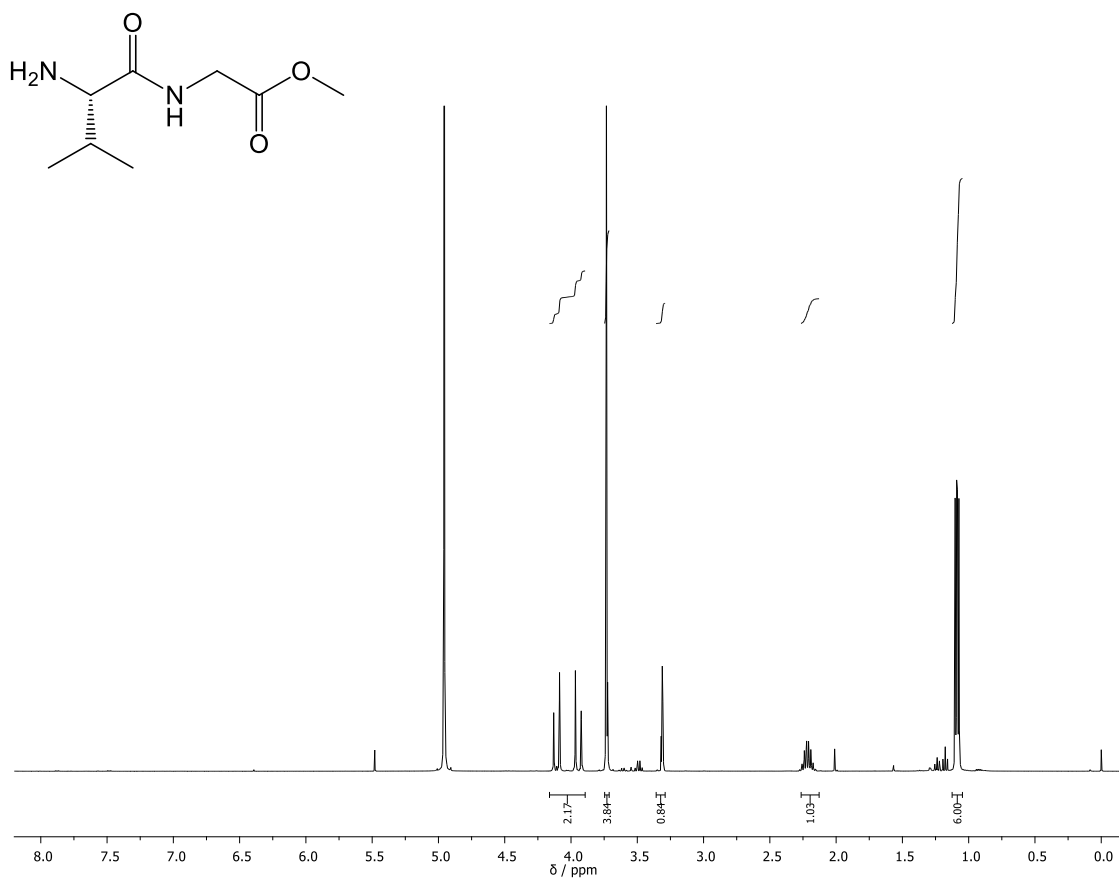
No final da reação, eliminou-se o solvente por pressão reduzida e para eliminar o excesso de TFA coevaporou-se com DCM (3 × 10 mL). No final obteve-se um óleo amarelado (**29**) (0.150 g) e o rendimento da reação foi de 80,0%.

Composto: óleo amarelado

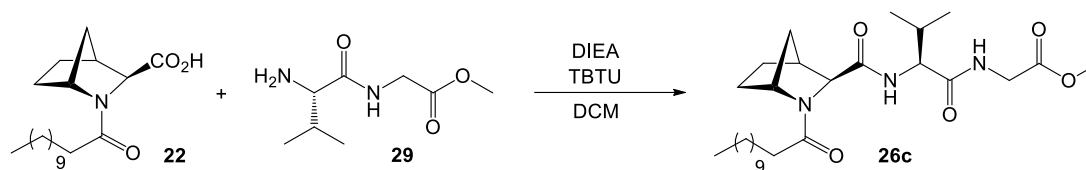
R_f: 0,28 em AcOEt

[α]_D²⁴ = − 16,3 (c1, MeOH)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,16–3,89 (m, 2H, H_{Gly}-2); 3,75–3,71 (m, 4H, OCH₃); 3,31 (d, J = 3,3 Hz, 1H, H_{Val}-2); 2,26–2,13 (m, 1H, H_{Val}-3); 1,09 (dd, J = 6,9, 4,4 Hz, 6H, (CH₃)₂)



4.3.6 Síntese [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(lauroil)-2-azabicyclo-[2.2.1]heptane-3-carbonil]-L-valilglicinato de metilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o aminoácido **22** (0,150 g; 0,460 mmol) e o dipéptido (**29**) (0,150 g, 0,690 mmol, 1.5 eq.) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente Hex/AcOEt (4:1). Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**26c**) (0,170 g). O rendimento da reação foi de 77,3 %.

Composto: óleo amarelado

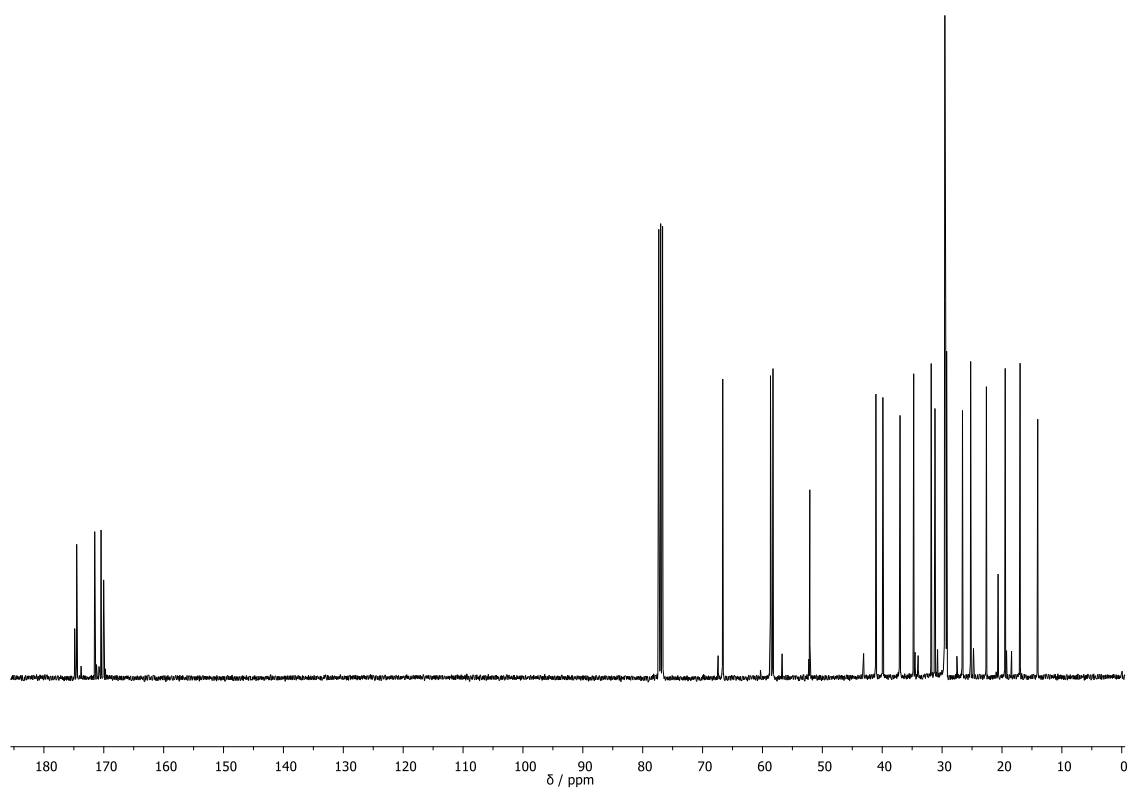
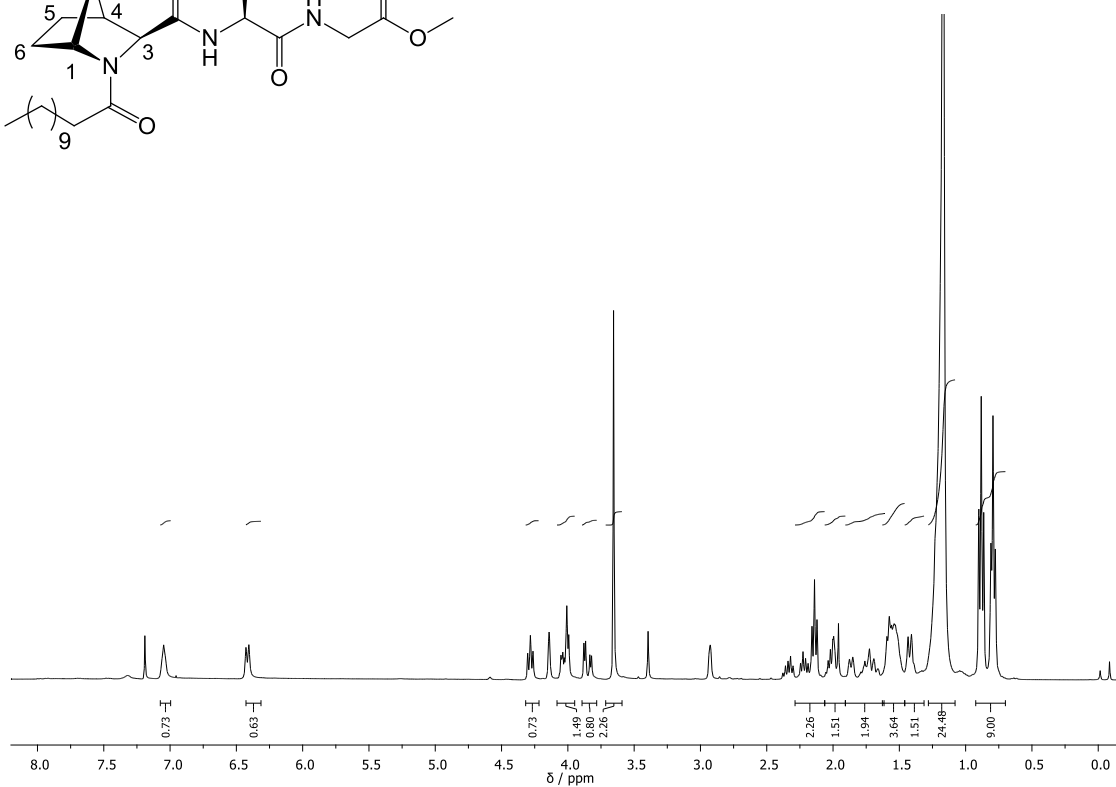
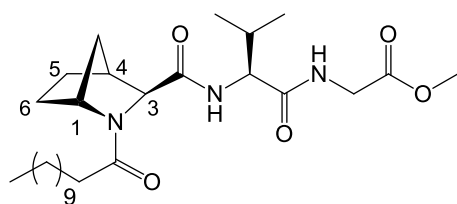
R_f: 0,46 em Hexano/AcOEt (4:1)

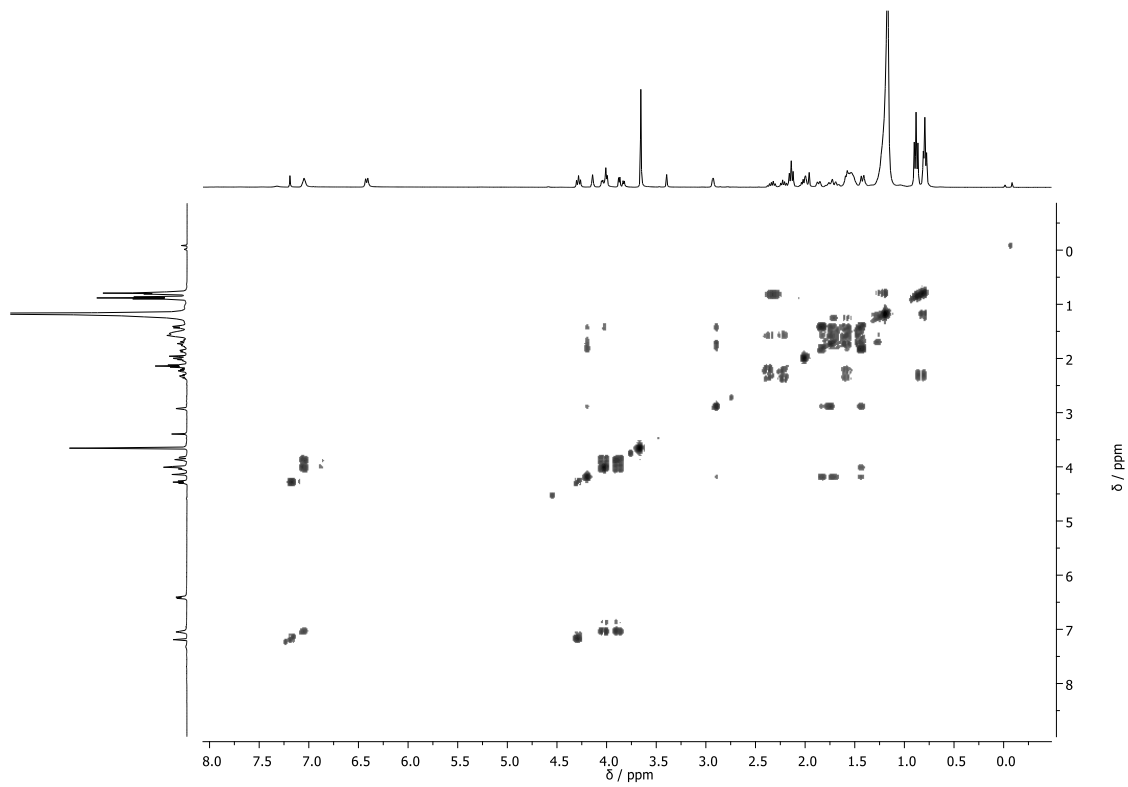
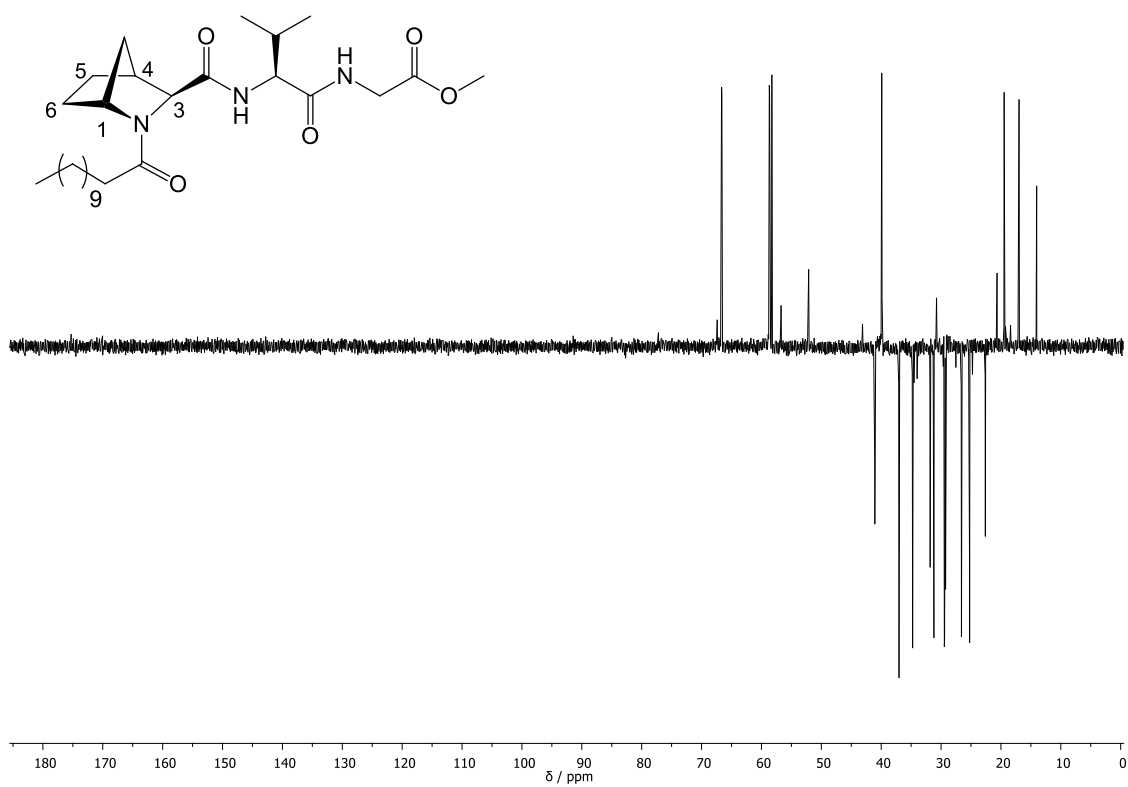
[α]_D²⁴ = – 29 (c1, MeOH)

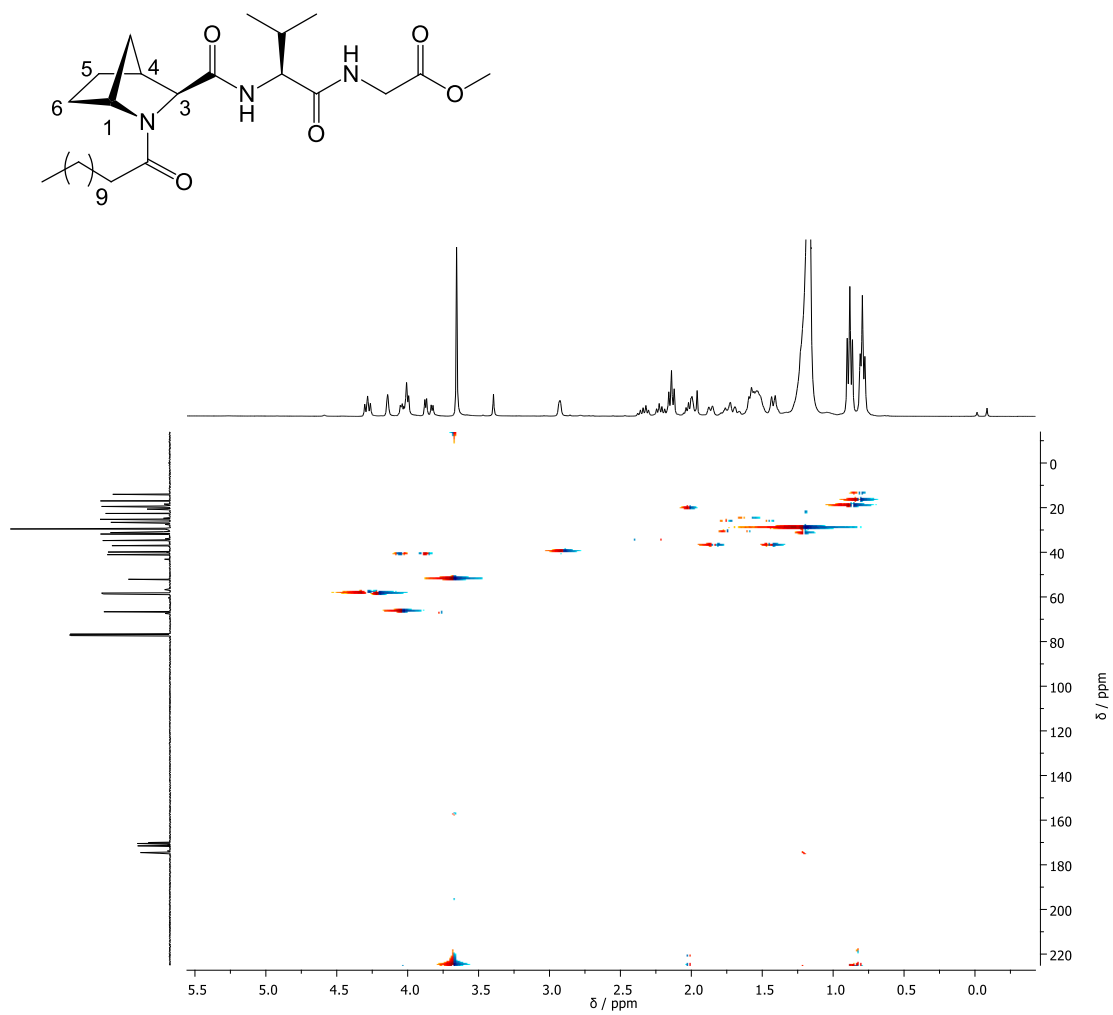
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,00 (d, *J* = 37,4 Hz, 1H, CONH); 6,42 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, CONH); 4,28 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, H_{Val-2}); 4,14 (s, 1H, H-1); 4,08–3,77 (m, 3H, H-3 + H_{Gly-2}); 3,66 (s, 3H, CO₂CH₃); 2,89 (d, *J* = 27,8 Hz, 1H, H-4); 2,39–2,15 (m, 1H, H_{Val-3}); 2,17–2,05 (m, 2H); 2,06–1,90 (m, 2H); 1,90–1,63 (m, 2H); 1,54 (m, 4H); 1,38 (dd, *J* = 34,2, 7,4 Hz, 2H); 1,17 (s, 16H, (CH₂)₈); 0,84 (dt, *J* = 13,1, 7,1 Hz, 9H, H_{Val-4} + (CH₂)₈CH₃)

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: [174,52 (C), 171,51 (C), 170,45 (C), 170,02 (C), CON + CONH + COOEt], 66,88 (CH, C-3); 58,66 (CH, C-1); 58,25 (CH, C_{Val-2}); 52,10 (CH₃, COOCH₃); 41,06 (CH₂, C_{Gly-2}); 39,90 (CH, C-4); 30,75 (CH, C_{Val-3}); 19,46–16,98 (CH₃, C_{Val-3}(CH₃)₂); 14,03 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

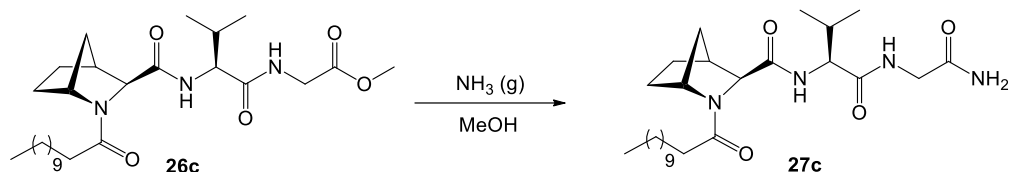
EM (ESI): *m/z* calculado para [M]⁺ 494,35, obtido 494,37







4.3.7 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-valilglicinamida



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **27a** (secção 4.4.6.), procedeu-se á aminólise do tripéptido **26c** (0,050 g; 0,101 mmol) durante 4h á temperatura ambiente e esta foi controlada por TLC.

Posteriormente, eliminou-se o solvente por pressão reduzida e para eliminar o excesso de NH_3 coevaporou-se com DCM (3×10 mL). No final obteve-se um óleo amarelado (**27c**) (0,040 g) e o rendimento da reação foi de 83,0%.

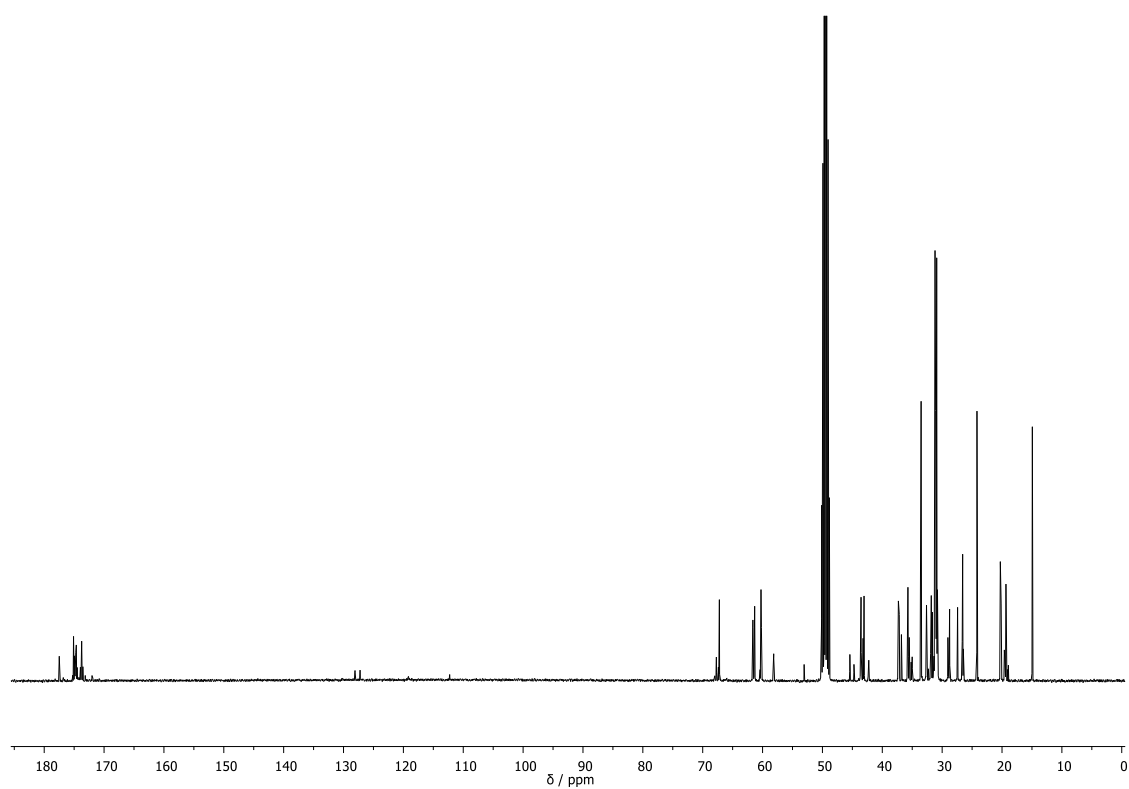
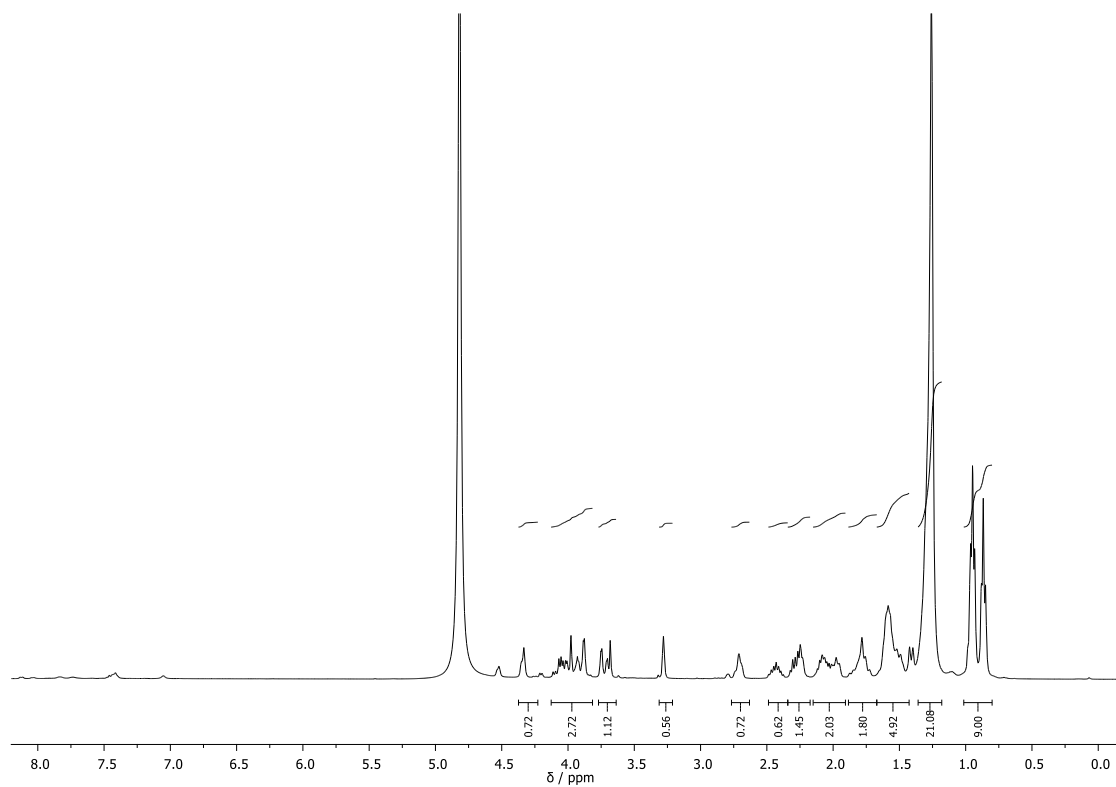
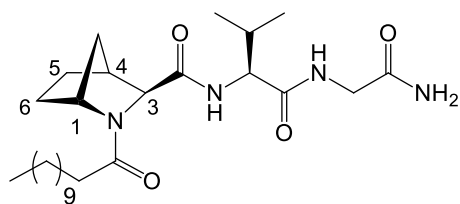
Composto: óleo amarelado

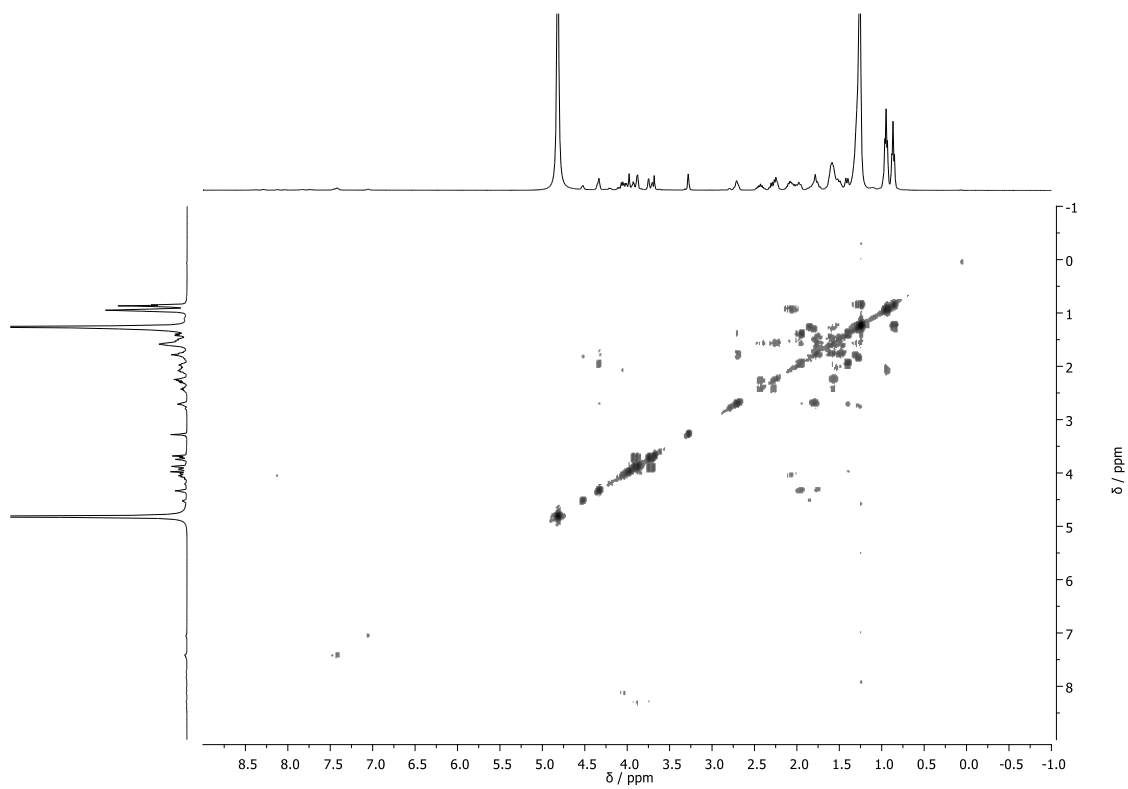
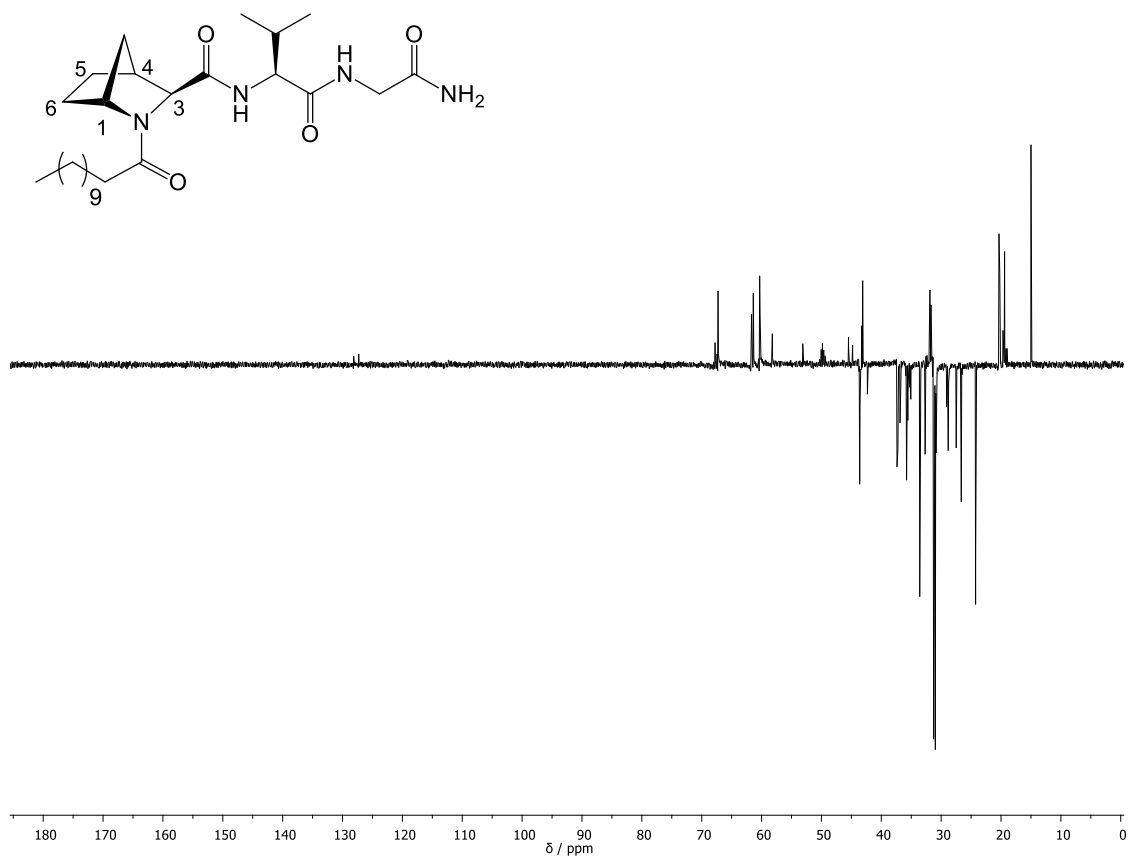
$$[\alpha]_D^{24} = -40,2 \text{ (} c1, \text{ MeOH)}$$

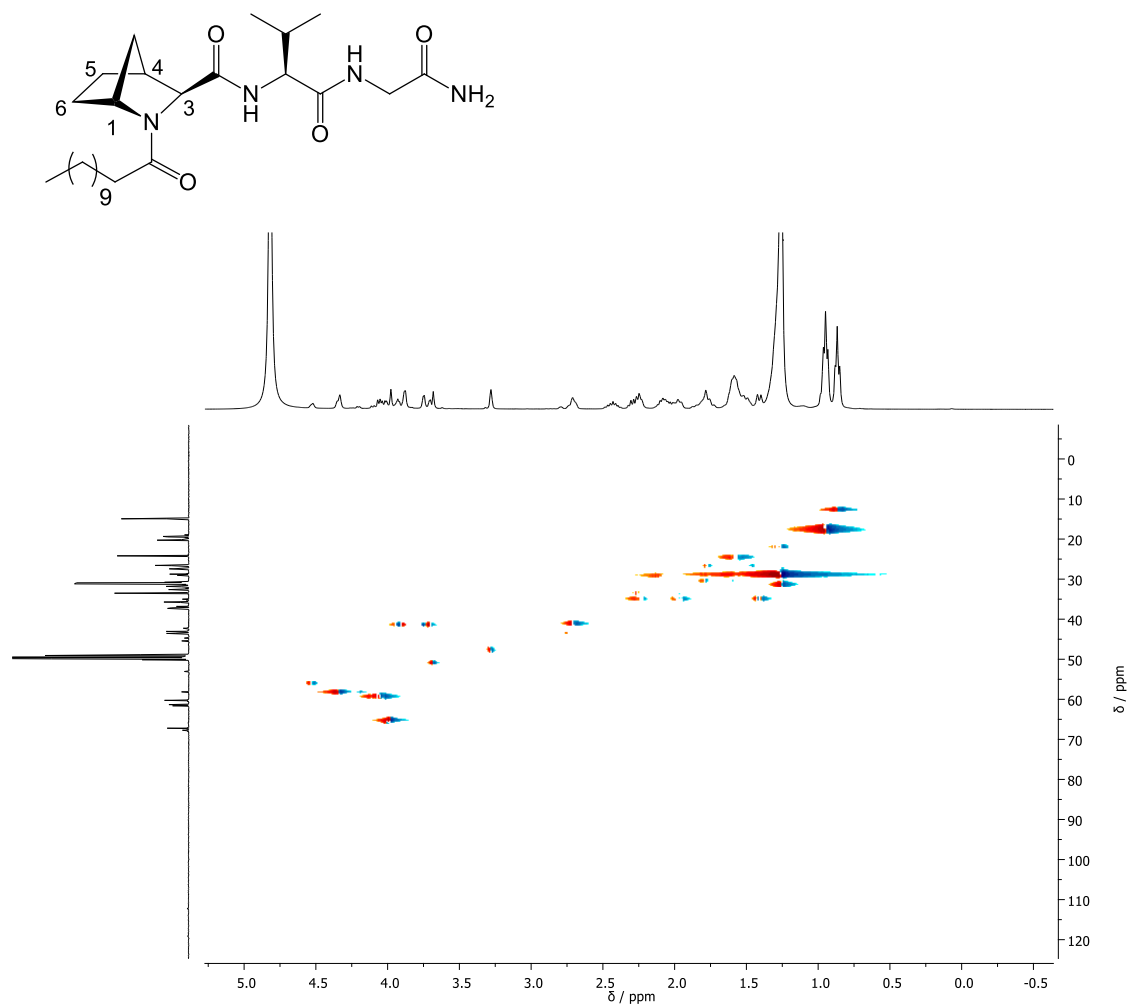
^1H -RMN (400 MHz, MeOD) δ : 4,39–4,20 (m, 1H, $\text{H}_{\text{Val-2}}$); 4,11–3,94 (m, 2H, $\text{H-3} + \text{H}_{\text{Gly-2}}$); 3,96–3,62 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Gly-2}} + \text{H-1}$); 3,30 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H); 2,75 (d, $J = 33,1$ Hz, 1H, H-4); 2,51–2,34 (m, 1H); 2,32–2,16 (m, 1H, $\text{H}_{\text{Val-3}}$); 2,16–1,89 (m, 2H); 1,86–1,67 (m, 2H); 1,69–1,37 (m, 6H); 1,26 (s, 16H, $(\text{CH}_2)_8$); 1,01–0,77 (m, 9H, $\text{H}_{\text{Val-4}} + (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)

^{13}C -RMN e DEPT (100 MHz, MeOD) δ : [177,48 (C), 175,10 (C), 174,64 (C), 173,74 (C), CON + CONH + CONH₂], 68,42 – 67,03 (CH, C-3); 61,63 (CH, C-1); 60,29 (CH, $\text{C}_{\text{Val-2}}$); 43,61 (CH_2 , $\text{C}_{\text{Gly-2}}$); 43,19 (CH, C-4); 31,85 – 30,95 (CH, $\text{C}_{\text{Val-3}}$); 20,88 – 19,21 (CH_3 , $\text{C}_{\text{Val-3}}(\text{CH}_3)_2$); 15,00 (CH_3 , $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)

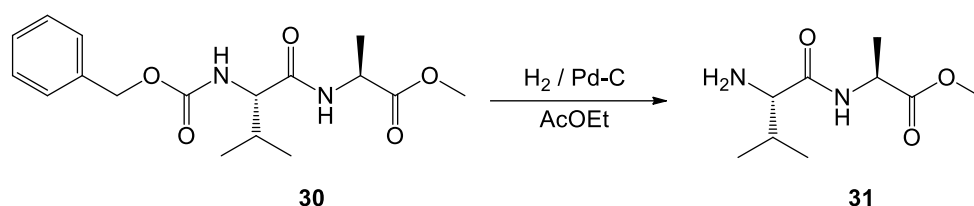
EM (ESI): m/z calculado para $[\text{M}]^-$ 476,35, obtido 476,34







4.3.8 Síntese de L-valil-L-alaninato de metilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **15a** (secção 4.3.6.), procedeu-se á hidrogenólise do dipéptido **30** num ambiente saturado de H₂ durante 4 horas.

Em seguida, removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt e MeOH. O solvente foi eliminado por pressão reduzida originando-se um óleo amarelo do dipéptido **31** (0,150 g). O rendimento da reação foi de 71,3%.

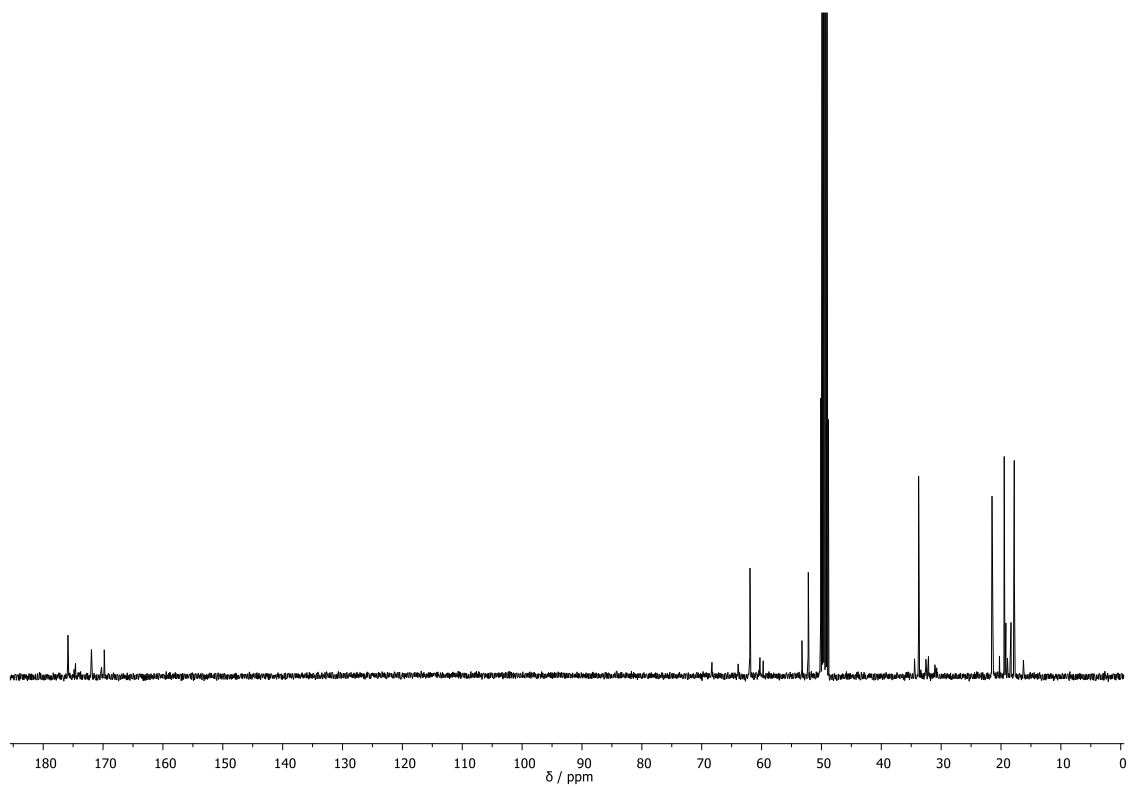
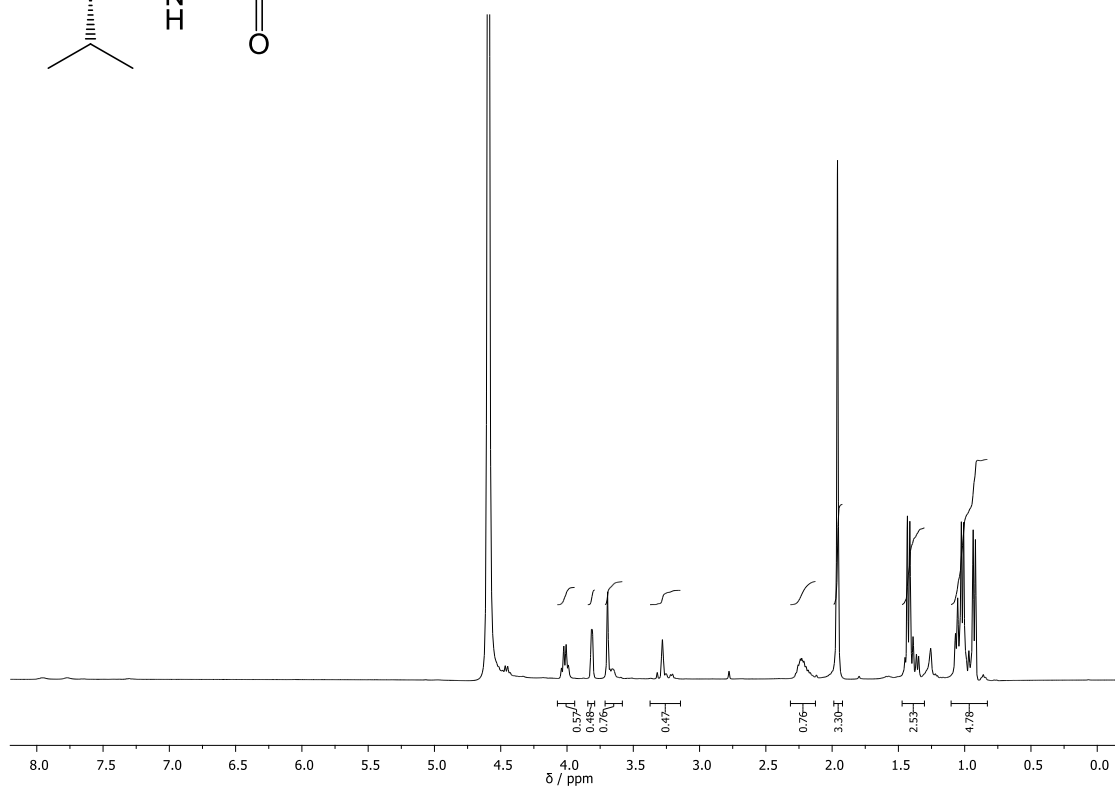
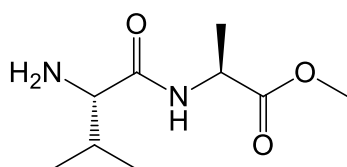
Composto: óleo amarelado

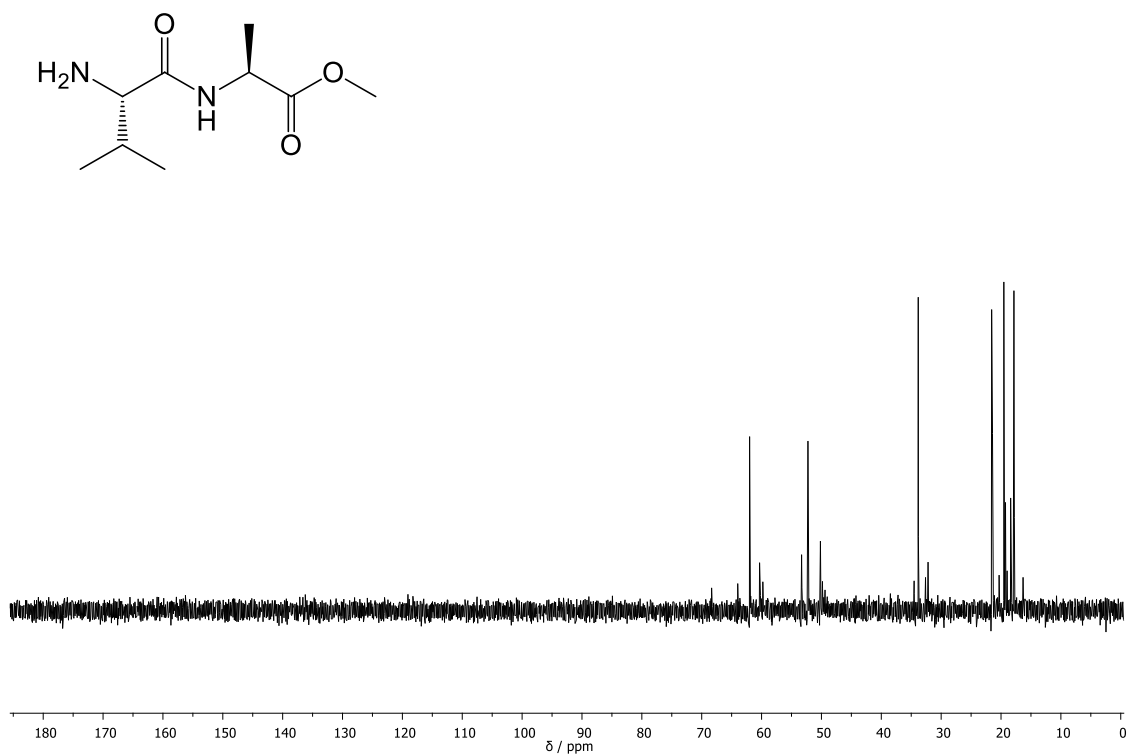
$$[\alpha]_D^{24} = -17 \text{ (c1, MeOH)}$$

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ: 4,02 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H, H_{Ala-2}); 3,81 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H, H_{Val-2}); 2,30–2,07 (m, 1H, H_{Val-3}); 1,96 (s, 4H, CO₂CH₃); 1,48–1,30 (m, 3H, H_{Ala-3}); 1,10 – 0,83 (m, 6H, H_{Val-4})

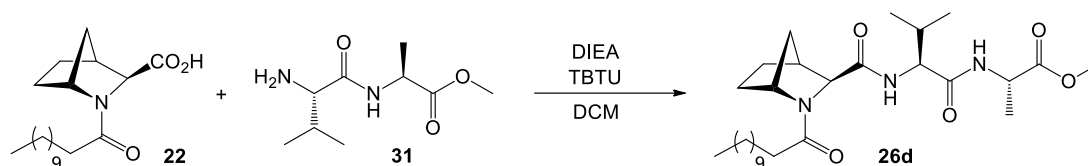
¹³C-RMN e DEPT (100 MHz, MeOD) δ: [175,87 (C), 171,94 (C), CONH + COOMe], 62,00 (C_{Val-2}); 52,25 (CH₃, COOCH₃); 33,83 (CH, C_{Ala-2}); 21,49 (CH, C_{Val-3}); 19,53 (CH₃, C_{Val-4}); 17,81 (CH₃, C_{Ala-3})

EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 203,13, obtido 203,14





4.3.9 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-valil-L-alaninato de metilo



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11w** (secção 4.3.3.), procedeu-se ao acoplamento entre o aminoácido **22** (0,150 g; 0,460 mmol) e o dipéptido (**31**) (0,140 g, 0,690 mmol, 1.5 eq.) deixando-se reagir durante 5h á temperatura ambiente e num ambiente inerte controlada por TLC.

No final da reação evaporou-se o solvente e de seguida procedeu-se a extrações líquido-líquido onde a fase orgânica lavou-se com NaHCO₃ e a fase aquosa com DCM. Secou-se a fase orgânica obtida com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se por vácuo e, por fim, evaporou-se o solvente.

Purificou-se o composto por cromatografia em coluna usando como eluente AcOEt. Recolheram-se as diferentes frações, evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo (**26d**) (0,170 g). O rendimento da reação foi de 72,8 %.

Composto: óleo amarelado

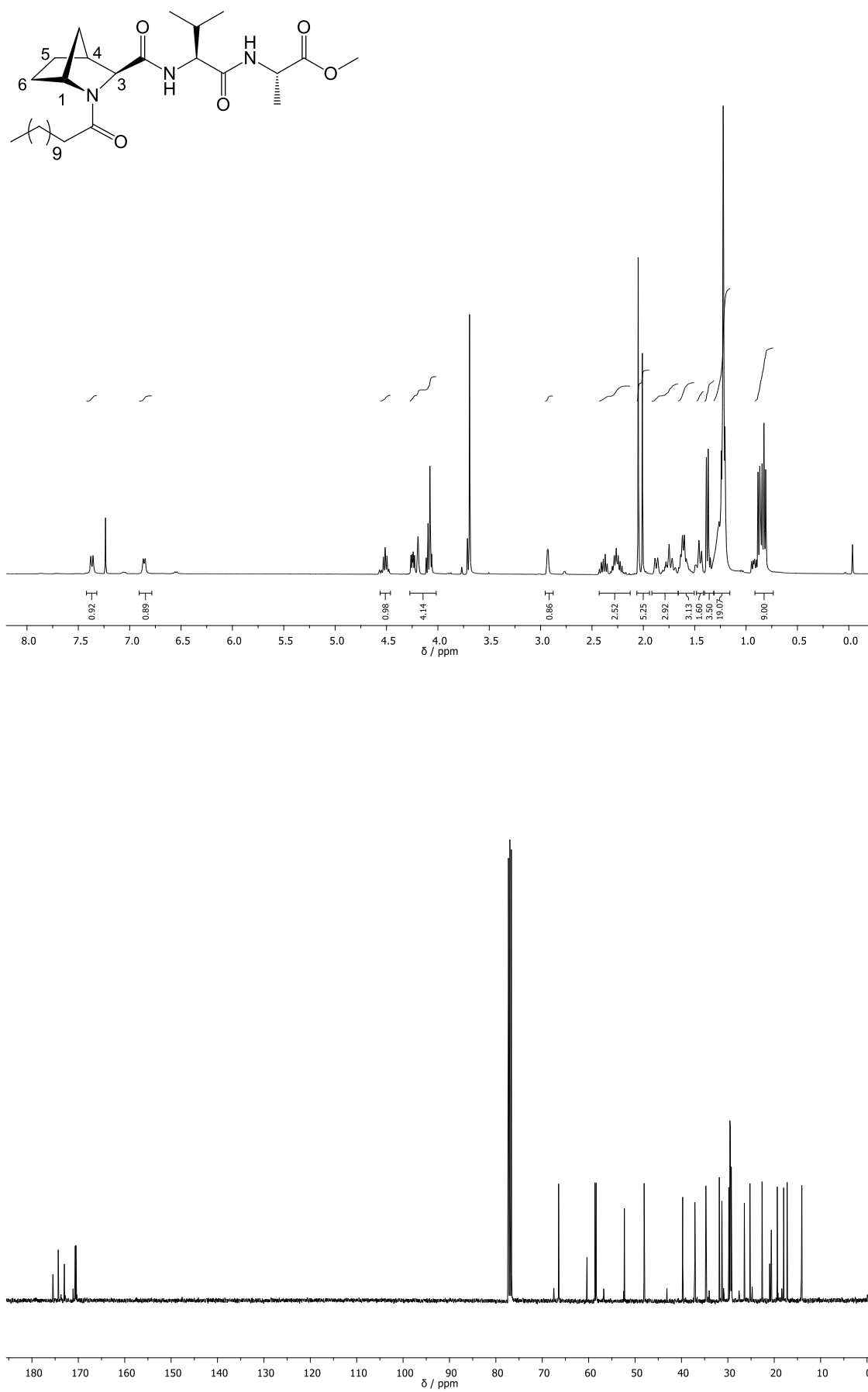
R_f: 0,43 em AcOEt

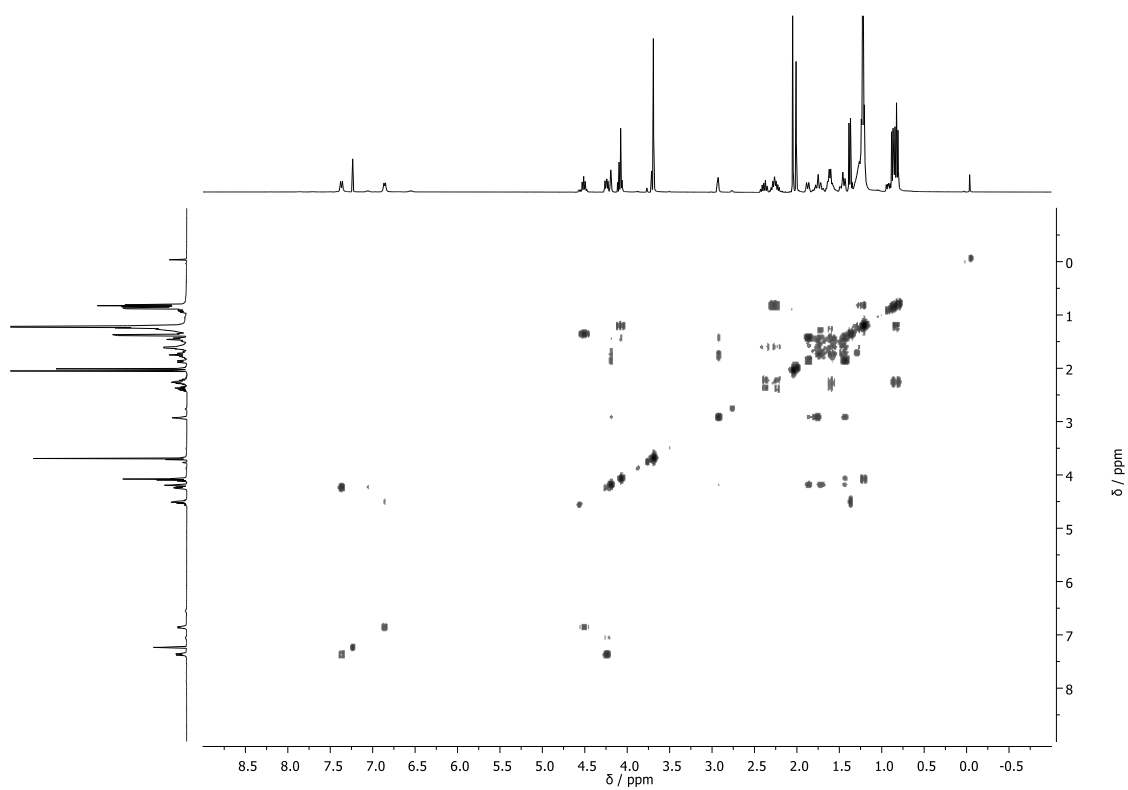
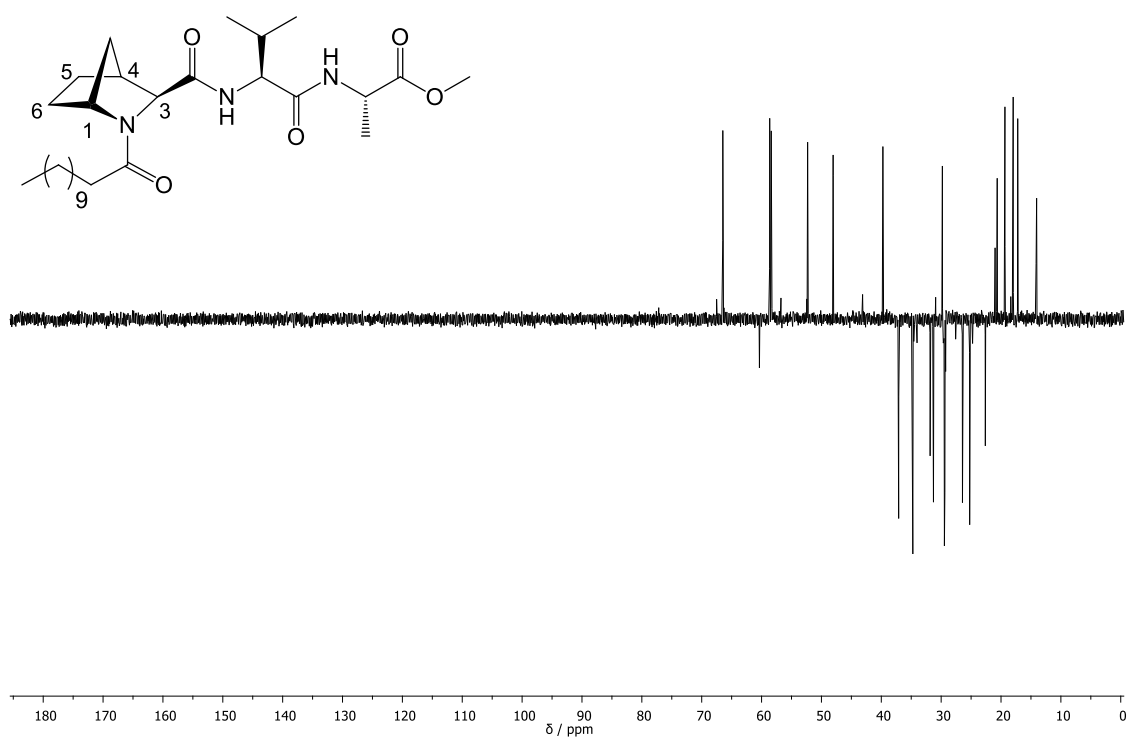
[α]_D²⁴ = – 99 (c1, MeOH)

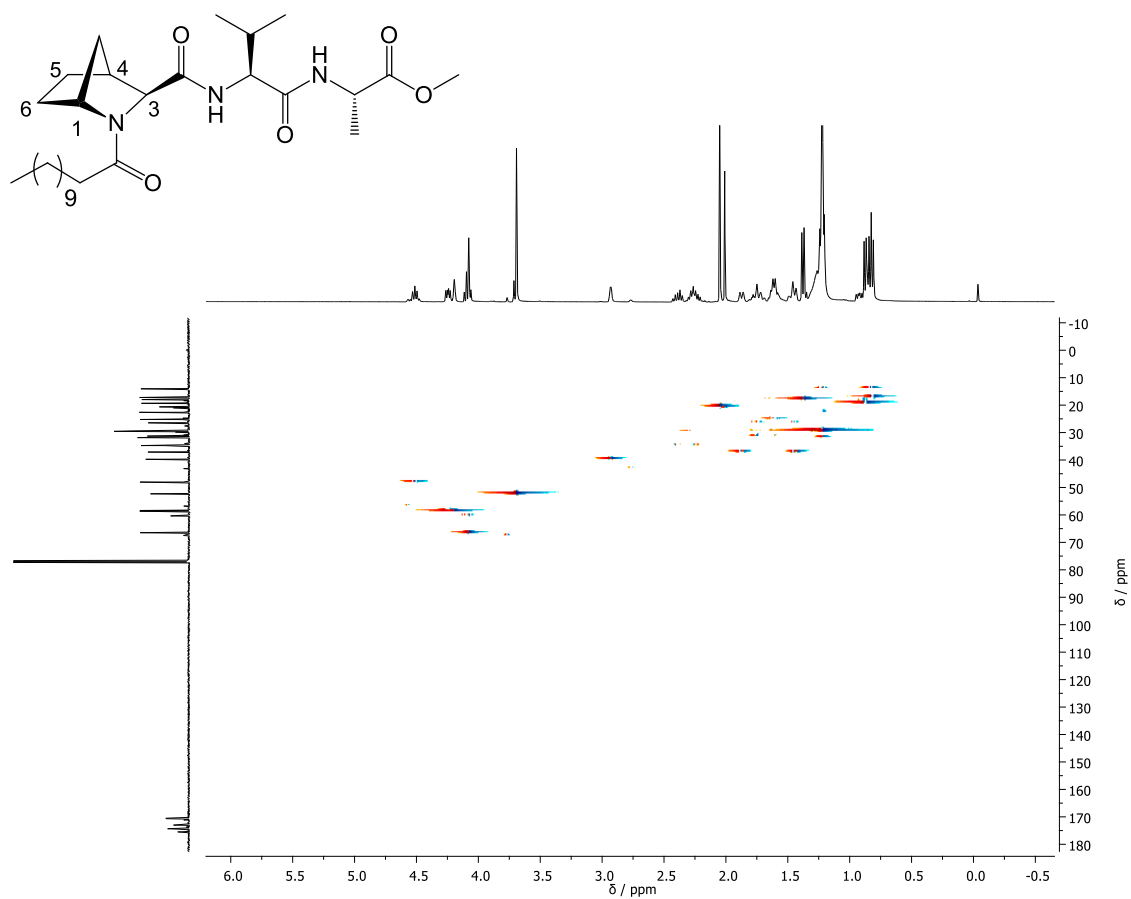
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,37 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, CONH); 6,86 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, CONH); 4,52 (dq, *J* = 14,4, 7,3 Hz, 1H, H_{Val-2}); 4,29 – 4,02 (m, 4H, H-3 + H_{Ala-2} + H-1); 3,69 (s, 3H, COOCH₃); 2,93 (s, 1H, H-4); 2,39 (dt, *J* = 15,3, 7,7 Hz, 1H, H_{Val-3}); 2,32 – 2,17 (m, 2H); 2,03 (d, *J* = 16,1 Hz, 5H); 1,92 – 1,67 (m, 3H); 1,59 (m, 3H); 1,46 (t, *J* = 11,0 Hz, 2H); 1,36 (dd, *J* = 16,2, 8,1 Hz, 3H, H_{Ala-3}); 1,31 – 1,14 (m, 16H, (CH₂)₈); 0,95 – 0,73 (m, 9H, H_{Val-4} + (CH₂)₈CH₃)

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: [175,48 (C), 174,33 (C), 173,01 (C), 170,67 (C), CON + CONH + COOEt], 66,47 (CH, C-3); 58,64 (CH, C-1); 58,38 (CH, C_v-2); 52,30 (CH₃, COOCH₃); 48,04 (CH, C_{Ala}-2); 39,73 (CH, C-4); 29,72 (CH, C_{Val}-3); 19,35-17,97 (C_{Val}-4); 17,21 (CH₃, C_{Ala}-3); 14,09 (CH₃, (CH₂)₈CH₃)

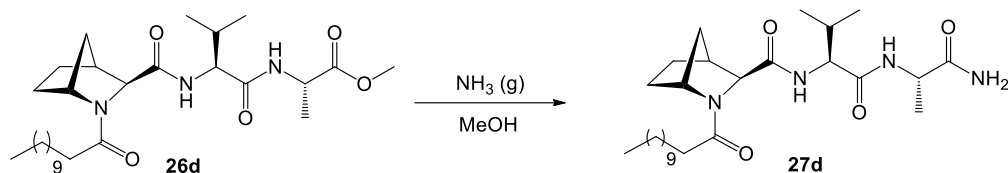
EM (ESI): m/z calculado para [M]⁺ 507,37, obtido 507,38







4.3.10 Síntese de [(1*R*,3*S*,4*S*)-2-lauroil-2-azanorbornano-3-carbonil]-L-valil-L-alaninamida



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **27a** (secção 4.4.6.), procedeu-se á aminólise do tripéptido **26d** (0,060 g; 0,118 mmol) durante 4h á temperatura ambiente e esta foi controlada por TLC.

Posteriormente, eliminou-se o solvente por pressão reduzida e para eliminar o excesso de NH_3 coevaporou-se com DCM (3×10 mL). No final obteve-se um óleo amarelado (**27d**) (0,050 g) e o rendimento da reação foi de 87,0%.

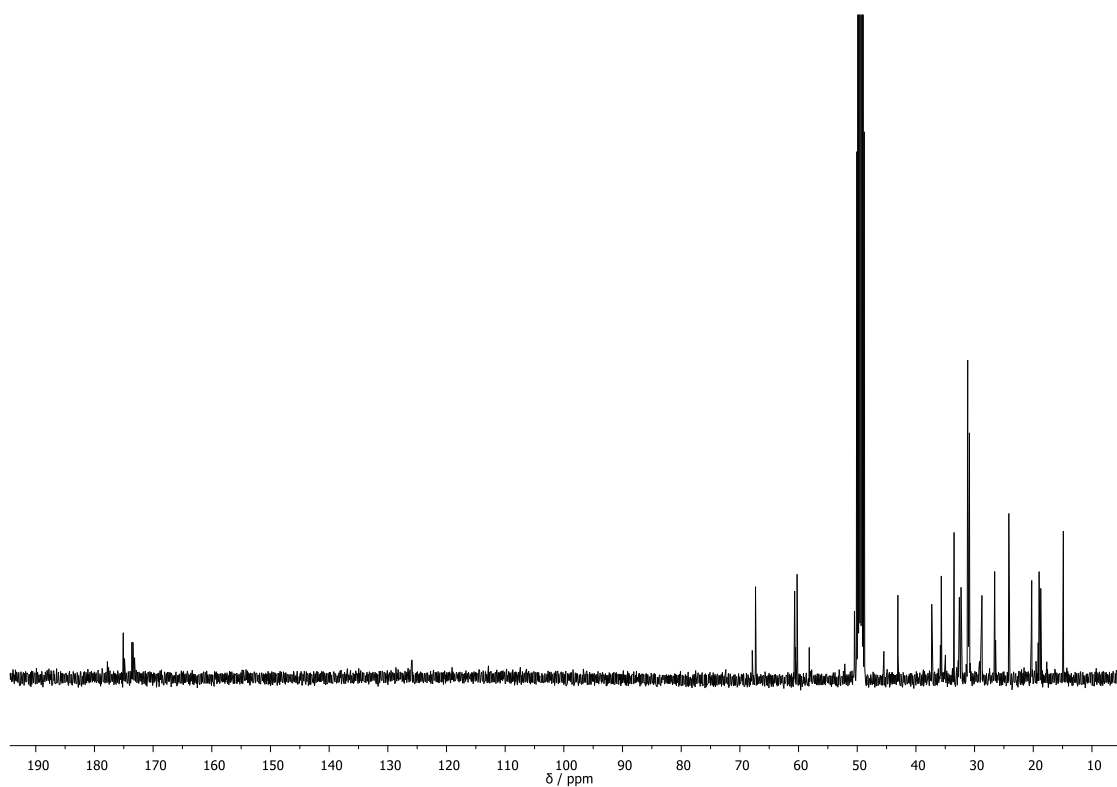
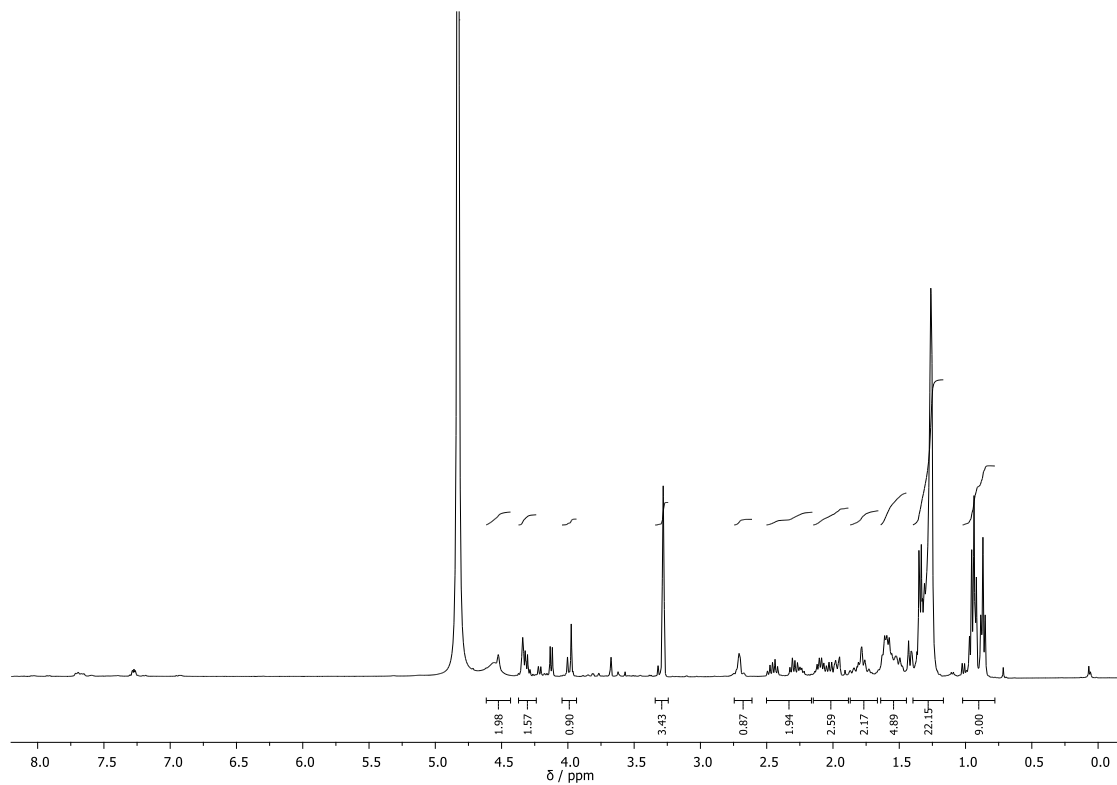
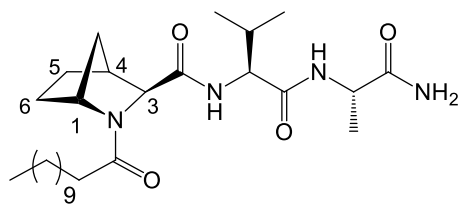
Composto: óleo amarelado

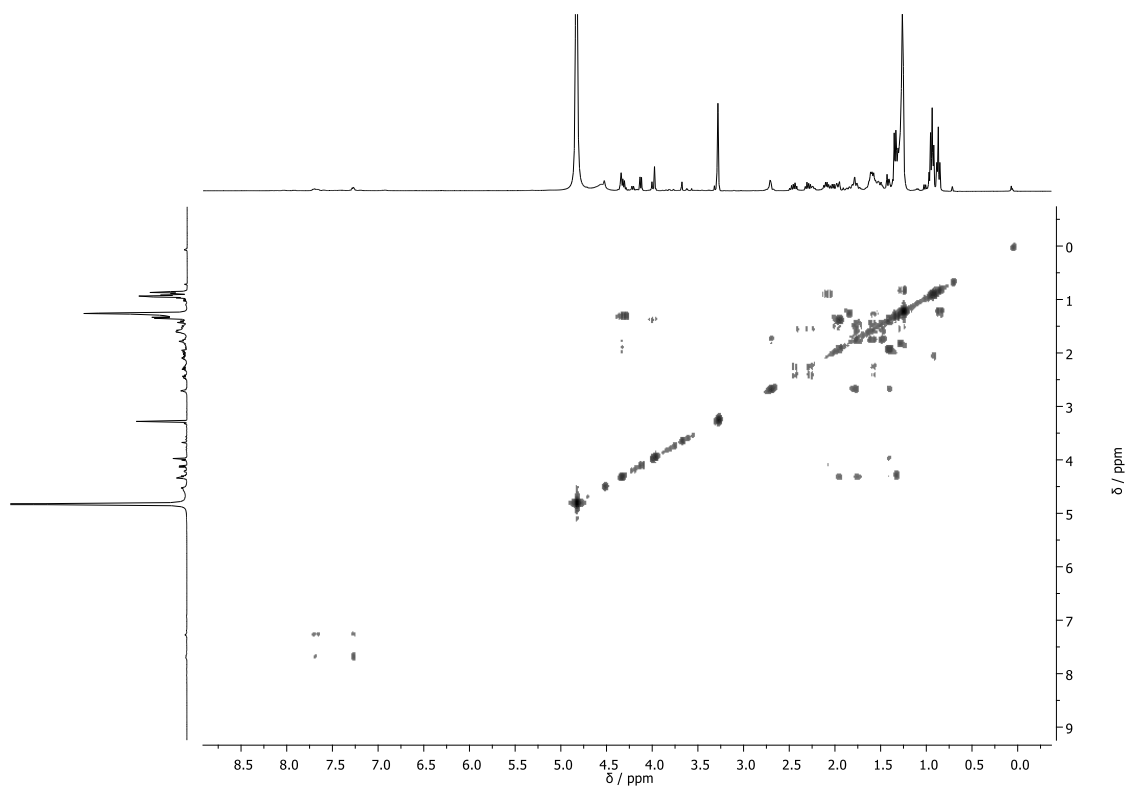
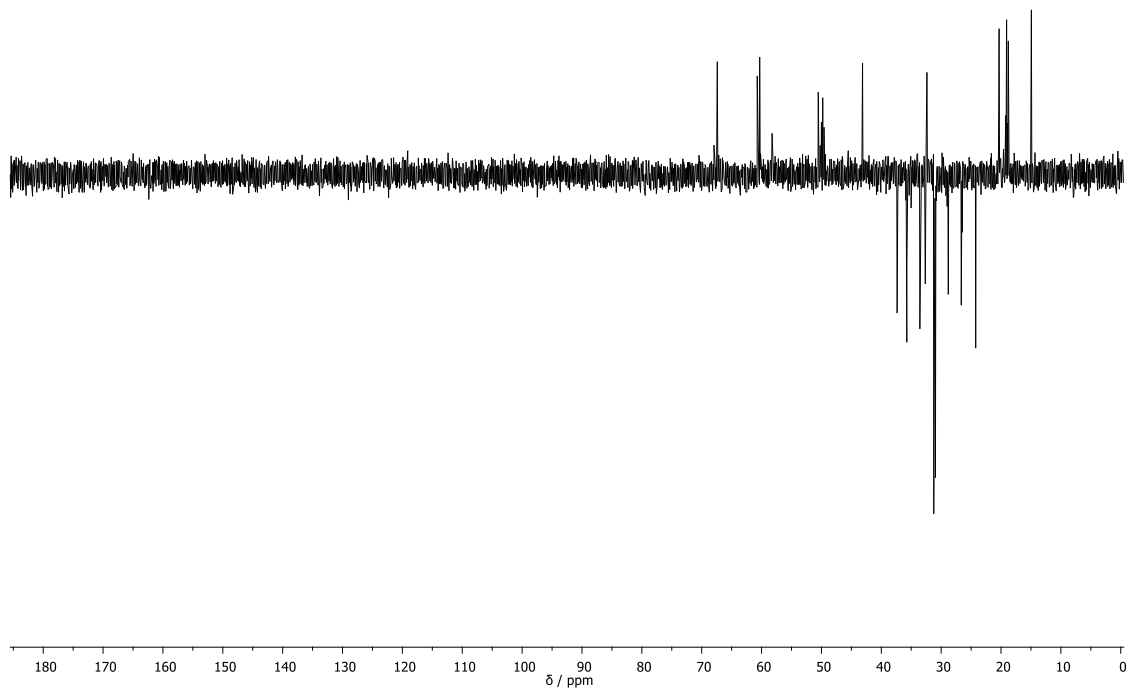
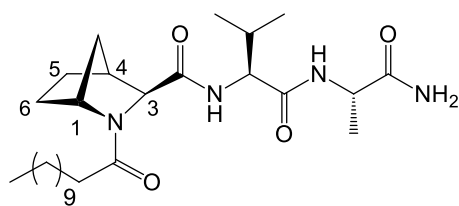
$$[\alpha]_D^{24} = -37 \text{ (c1, MeOH)}$$

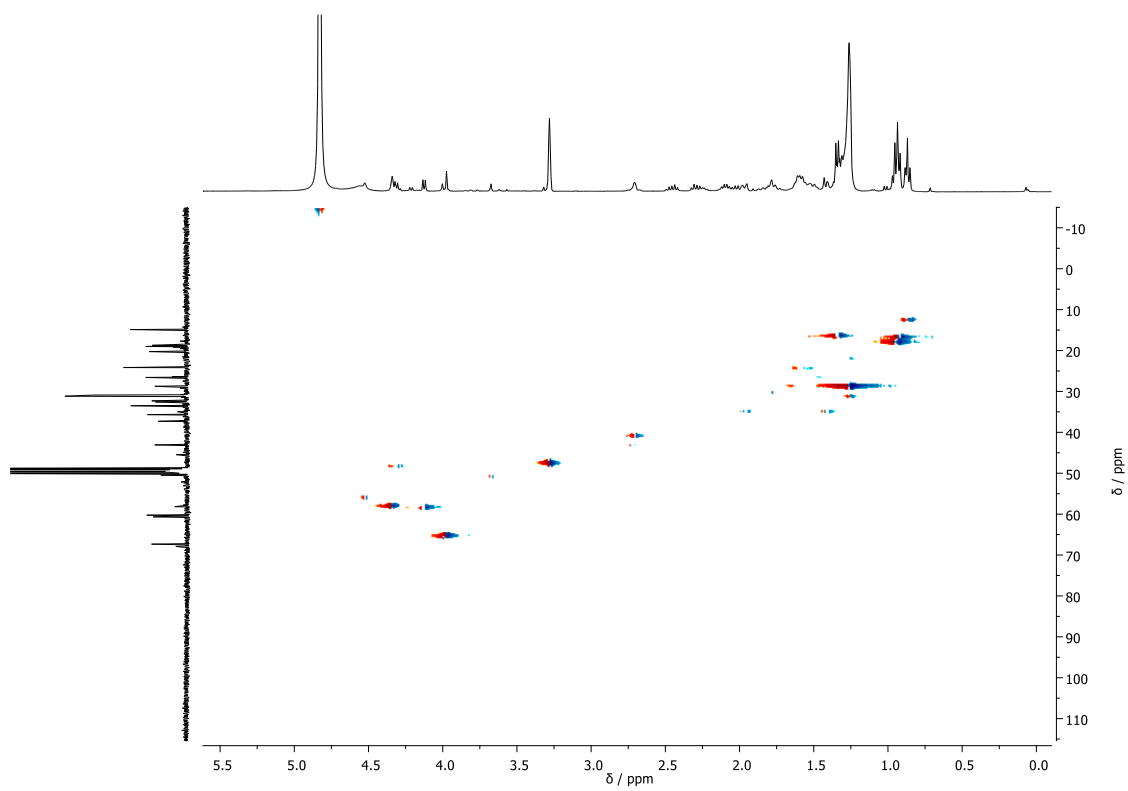
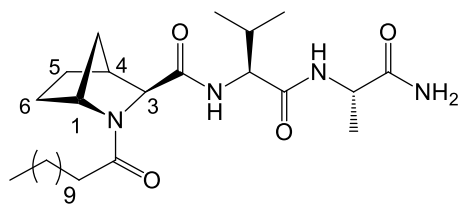
^1H -RMN (400 MHz, MeOD) δ : 4,54 (d, $J = 12,3$ Hz, 2H); 4,38 – 4,25 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Val-2}} + \text{H-1}$); 4,23 – 4,17 (m, 1H, $\text{H}_{\text{Ala-2}}$); 4,10 (t, $J = 16,5$ Hz, 1H); 3,98 (dd, $J = 11,0, 5,4$ Hz, 1H, H-3); 2,78 – 2,62 (m, 1H, H-4); 2,50 – 2,19 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Val-3}}$); 2,14 – 1,90 (m, 2H); 1,93 – 1,69 (m, 2H); 1,67 – 1,45 (m, 5H); 1,41 (dd, $J = 10,0, 8,1$ Hz, 1H); 1,37 – 1,32 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Ala-3}}$); 1,29 (d, $J = 19,1$ Hz, 16H, $(\text{CH}_2)_8$); 1,00 – 0,83 (m, 9H, $\text{H}_{\text{Val-4}} + (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)

^{13}C -RMN (100 MHz, MeOD) δ : [175,09 (C), 173,63 (C), 173,44 (C), 173,19–173,02 (C), CON + CONH + CONH₂]; 67,39 (CH, C-3); 60,52 (CH, C-1); 51,95 – 49,67 (CH, C_{v-2}); 42,97 – 42,34 (CH, C_{Ala-2}); 32,51 (CH, C-4); 20,32 (CH, C_{Val-3}); 19,07, (C_{Val-4}); 18,79 (C_{Ala-3}) 14,93 (CH₃, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)

EM (ESI): m/z calculado para $[\text{M}]^-$ 491,37, obtido 491,36







Referências bibliográficas

1. Nelson, D. L.; Lehninger, A. L.; Cox, M. M., *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan: 2008.
2. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemistry*, ; W. H. Freeman and Company: New York: 2002.
3. Tuchscherer, G.; Mutter, M., Peptidomimetics for Bridging Structure and Function: Pseudo-Prolines (Ψ Pro) in Peptide Synthesis, Molecular Recognition, and Drug Design. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2001**, 55 (4), 306-313.
4. Cerminara, I.; Chiummiento, L.; Funicello, M.; Guarnaccio, A.; Lupattelli, P., Heterocycles in peptidomimetics and pseudopeptides: design and synthesis. *Pharmaceuticals* **2012**, 5 (3), 297-316.
5. Khrustalev, D. P.; Suleimenova, A. A.; Fazylov, S. D.; Gazaliev, A. M., Synthesis of 2-substituted-1,3-oxazolidines under microwave irradiation. *Russian Journal of General Chemistry* **77** (5), 969-969.
6. Fernandez, X.; Fellous, R.; Lizzani-Cuvelier, L.; Loiseau, M.; Duñach, E., Chemo- and regioselective synthesis of alkyl-3-thiazoline carboxylates. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42 (8), 1519-1521.
7. Karpyak, V.; Obushak, N.; Ganushchak, N., Method of preparation of 2, 5-disubstituted 2-thiazoline. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1997**, 33 (9), 1121-1122.
8. de los Santos, J. M.; Lopez, Y.; Aparicio, D.; Palacios, F., A convenient synthesis of substituted pyrazolidines and azaproline derivatives through highly regio- and diastereoselective reduction of 2-pyrazolines. *The Journal of organic chemistry* **2008**, 73 (2), 550-557.
9. Liu, H.; Du, D. M., Recent Advances in the Synthesis of 2-Imidazolines and Their Applications in Homogeneous Catalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2009**, 351 (4), 489-519.
10. Robinson, J. A., The design, synthesis and conformation of some new β -hairpin mimetics: novel reagents for drug and vaccine discovery. *Synlett* **2000**, 2000 (04), 429-441.
11. Sabol, J. S.; Flynn, G. A.; Friedrich, D.; Huber, E. W., Constrained amino acids. The synthesis of glutamine mimetics. *Tetrahedron letters* **1997**, 38 (21), 3687-3690.
12. Kahn, M.; Eguchi, M., Synthesis of peptides incorporating β -turn inducers and mimetics. Thieme: Stuttgart: 2003; Vol. 22, pp 695-740.

13. Lorthiois, E.; Marek, I.; Normant, J. F., Diastereoselective and enantioselective intramolecular amino-zinc-enolate carbometalation reactions. A new polysubstituted pyrrolidines synthesis. *The Journal of organic chemistry* **1998**, 63 (8), 2442-2450.
14. Beeli, R.; Steger, M.; Linden, A.; Robinson, J. A., A Tricyclic Template Derived from (2S, 4R)-4-Hydroxyproline for the Synthesis of Protein Loop Mimetics. *Helvetica chimica acta* **1996**, 79 (8), 2235-2248.
15. Damour, D.; Doerflinger, G.; Pantel, G.; Labaudinière, R.; Leconte, J.-P.; Sable, S.; Vuilhorgne, M.; Mignani, S., A CONVENIENT SYNTHETIC ROUTE TO MACROCYCLIC CIS-3-PHENYLPROLINE DERIVATIVES AS MIMICS OF SANDOSTATIN. *Synlett* **1999**, (2), 189-192.
16. Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. a. D., Stereoselective synthesis of quaternary α -amino acids. Part 2: Cyclic compounds. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11 (3), 645-732.
17. Damour, D.; Barreau, M.; Blanchard, J.-C.; Burgevin, M.-C.; Doble, A.; Pantel, G.; Labaudinière, R.; Mignani, S., Synthesis and binding affinities of novel spirocyclic lactam peptidomimetics of somatostatin. *Chemistry letters* **1998**, 1998 (9), 943-944.
18. (a) Duan, S.; Moeller, K. D., Building constrained peptidomimetics: a convenient approach to 3-phenyl-5-vinyl substituted proline derivatives. *Tetrahedron* **2001**, 57 (30), 6407-6415; (b) da Costa, J. F.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E., Synthesis of methyl (\pm)-3, 5-bis (substitutedmethyl) pyrrolidine-2-carboxylates: a convenient approach to proline-mimetics. *Tetrahedron* **2010**, 66 (34), 6797-6805.
19. Karoyan, P.; Sagan, S.; Lequin, O.; Quancard, J.; Lavielle, S.; Chassaing, G., Substituted prolines: syntheses and applications in structure-activity relationship studies of biologically active peptides. *Targets in heterocyclic systems* **2004**, 216-273.
20. Chamberlin, S. G.; Sargood, K. J.; Richter, A.; Mellor, J. M.; Anderson, D. W.; Richards, N. G.; Turner, D. L.; Sharma, R. P.; Alexander, P.; Davies, D. E., Constrained Peptide Analogues of Transforming Growth Factor- α Residues Cysteine 21-32 Are Mitogenically Active USE OF PROLINE MIMETICS TO ENHANCE BIOLOGICAL POTENCY. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270 (36), 21062-21067.
21. Wilby, K. J.; Partovi, N.; Ford, J.-A. E.; Greanya, E. D.; Yoshida, E. M., Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C. *Canadian Journal of Gastroenterology* **2012**, 26 (4), 205.
22. Jazwinski, A. B.; Muir, A. J., Direct-acting antiviral medications for chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterol Hepatol (NY)* **2011**, 7 (3), 154-162.

23. Flores, R.; Alibés, R.; Figueredo, M.; Font, J., Highly stereoselective synthesis of novel cyclobutane-fused azanucleosides. *Tetrahedron* **2009**, 65 (34), 6912-6917.
24. Piperno, A.; Giofre, S. V.; Iannazzo, D.; Romeo, R.; Romeo, G.; Chiacchio, U.; Rescifina, A.; Piotrowska, D. G., Synthesis of C-4' Truncated phosphonated carbocyclic 2'-Oxa-3'-azanucleosides as antiviral agents. *The Journal of organic chemistry* **2010**, 75 (9), 2798-2805.
25. Hökfelt, T.; Broberger, C.; Xu, Z.-Q. D.; Sergeev, V.; Ubink, R.; Diez, M., Neuropeptides—an overview. *Neuropharmacology* **2000**, 39 (8), 1337-1356.
26. Trabocchi, A.; Scarpi, D.; Guarna, A., Structural diversity of bicyclic amino acids. *Amino acids* **2008**, 34 (1), 1-24.
27. Colbourne, H.; Gowans, D., *Inquiry Into Biology*. McGraw-Hill Ryerson: 2007.
28. Geula, C.; Mesulam, M.-M., Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* **1995**, 9, 23-28.
29. Obeso, J. A.; Rodríguez-Oroz, M. C.; Benitez-Temino, B.; Blesa, F. J.; Guridi, J.; Marin, C.; Rodriguez, M., Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement Disorders* **2008**, 23 (S3), S548-S559.
30. Al-Chalabi, A.; Leigh, P. N., Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Current opinion in neurology* **2000**, 13 (4), 397-405.
31. Samii, A.; Nutt, J. G.; Ransom, B. R., Parkinson's disease. *The Lancet* **2004**, 363 (9423), 1783-1793.
32. Chung, K. K.; Zhang, Y.; Lim, K. L.; Tanaka, Y.; Huang, H.; Gao, J.; Ross, C. A.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M., Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nature medicine* **2001**, 7 (10), 1144-1150.
33. Davie, C. A., A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin* **2008**, 86 (1), 109-127.
34. Männistö, P.; Ulmanen, I.; Lundström, K.; Taskinen, J.; Tenhunen, J.; Tilgmann, C.; Kaakkola, S., Characteristics of catechol O-methyltransferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors. In *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques*, Springer: 1992; pp 291-350.
35. Rascol, O.; Brooks, D. J.; Korczyn, A. D.; De Deyn, P. P.; Clarke, C. E.; Lang, A. E., A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early

Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *New England Journal of Medicine* **2000**, 342 (20), 1484-1491.

36. Imamura, A.; Uitti, R. J.; Wszolek, Z. K., Dopamine agonist therapy for Parkinson disease and pathological gambling. *Parkinsonism & related disorders* **2006**, 12 (8), 506-508.

37. Points, E., Effect of deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med* **1989**, 1989 (321), 1364-1371.

38. Ives, N. J.; Stowe, R. L.; Marro, J.; Counsell, C.; Macleod, A.; Clarke, C. E.; Gray, R.; Wheatley, K., Monoamine oxidase type B inhibitors in early Parkinson's disease: meta-analysis of 17 randomised trials involving 3525 patients. *BMJ* **2004**, 329 (7466), 593.

39. Group, P. S., A controlled trial of rasagiline in early Parkinson disease: the TEMPO Study. *Archives of Neurology* **2002**, 59 (12), 1937.

40. Dumas, J. A.; Newhouse, P. A., The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **2011**, 99 (2), 254-261.

41. Bryson, H. M.; Benfield, P., Donepezil. *Drugs & aging* **1997**, 10 (3), 234-9; discussion 240-1.

42. Spencer, C. M.; Noble, S., Rivastigmine. *Drugs & aging* **1998**, 13 (5), 391-411.

43. Fulton, B.; Benfield, P., Galanthamine. *Drugs & aging* **1996**, 9 (1), 60-5; discussion 66-7.

44. Haass, C.; Selkoe, D. J., Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature reviews Molecular cell biology* **2007**, 8 (2), 101-112.

45. Salloway, S.; Sperling, R.; Gilman, S.; Fox, N.; Blennow, K.; Raskind, M.; Sabbagh, M.; Honig, L.; Doody, R.; Van Dyck, C., A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* **2009**, 73 (24), 2061-2070.

46. Yu, Y.; Li, X.; Blanchard, J.; Li, Y.; Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.-X., Insulin sensitizers improve learning and attenuate tau hyperphosphorylation and neuroinflammation in 3xTg-AD mice. *Journal of Neural Transmission* **2015**, 122 (4), 593-606.

47. Hölscher, C., Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions* **2011**, 39 (4), 891-897.

48. Yamamoto, H.; Murphy, L., Enzymatic conversion of IGF-I to des (1–3) IGF-I in rat serum and tissues: a further potential site of growth hormone regulation of IGF-I action. *Journal of endocrinology* **1995**, 146 (1), 141-148.
49. (a) Hruby, V. J., Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, 1 (11), 847-858; (b) Yaron, A.; Naider, F.; Scharpe, S., Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **1993**, 28 (1), 31-81.
50. Beausoleil, E.; Lubell, W. D., Steric effects on the amide isomer equilibrium of prolyl peptides. Synthesis and conformational analysis of N-acetyl-5-tert-butylproline N'-methyamides. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118 (51), 12902-12908.
51. Beausoleil, E.; Sharma, R.; Michnick, S. W.; Lubell, W. D., Alkyl 3-position substituents retard the isomerization of prolyl and hydroxyprolyl amides in water. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63 (19), 6572-6578.
52. Wittelsberger, A.; Keller, M.; Scarpellino, L.; Patiny, L.; Acha-Orbea, H.; Mutter, M., Pseudoprolines: Targeting a cis Conformation in a Mimetic of the gp120 V3 Loop of HIV-1. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39 (6), 1111-1115.
53. Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L.; Clark, R.; Gluckman, P., N-terminal tripeptide of IGF-1 (GPE) prevents the loss of TH positive neurons after 6-OHDA induced nigral lesion in rats. *Brain research* **2000**, 859 (2), 286-292.
54. Aguado-Llera, D.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; Arilla-Ferreiro, E.; Barrios, V., Gly-Pro-Glu protects β -amyloid-induced somatostatin depletion in the rat cortex. *Neuroreport* **2004**, 15 (12), 1979-1982.
55. (a) Newman, M. F.; Mathew, J. P.; Grocott, H. P.; Mackensen, G. B.; Monk, T.; Welsh-Bohmer, K. A.; Blumenthal, J. A.; Laskowitz, D. T.; Mark, D. B., Central nervous system injury associated with cardiac surgery. *The Lancet* **2006**, 368 (9536), 694-703; (b) Raja, P. V.; Blumenthal, J. A.; Doraiswamy, P. M., Cognitive deficits following coronary artery bypass grafting: prevalence, prognosis, and therapeutic strategies. *CNS spectrums* **2004**, 9 (10), 763-772.
56. Baker, A.; Batchelor, D.; Thomas, G.; Wen, J.; Rafiee, M.; Lin, H.; Guan, J., Central penetration and stability of N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-I, glycine-proline-glutamate in adult rat. *Neuropeptides* **2005**, 39 (2), 81-87.
57. Guan, J.; Thomas, G.; Lin, H.; Mathai, S.; Bachelor, D.; George, S.; Gluckman, P., Neuroprotective effects of the N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1, glycine-proline-glutamate (GPE) following intravenous infusion in hypoxic–ischemic adult rats. *Neuropharmacology* **2004**, 47 (6), 892-903.

58. Schmid, F. X.; Mayr, L. M.; Mucke, M.; Schonbrunner, E. R., Prolyl isomerases: role in protein folding. *Advances in protein chemistry* **1993**, *44*, 25-66.
59. Bickerdike, M. J.; Thomas, G. B.; Batchelor, D. C.; Sirimanne, E. S.; Leong, W.; Lin, H.; Sieg, F.; Wen, J.; Brimble, M. A.; Harris, P. W., NNZ-2566: A Gly-Pro-Glu analogue with neuroprotective efficacy in a rat model of acute focal stroke. *Journal of the neurological sciences* **2009**, *278* (1), 85-90.
60. Trotter, N. S.; Brimble, M. A.; Harris, P. W.; Callis, D. J.; Sieg, F., Synthesis and neuroprotective activity of analogues of glycyl-L-prolyl-L-glutamic acid (GPE) modified at the α -carboxylic acid. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2005**, *13* (2), 501-517.
61. Harris, P. W.; Brimble, M. A.; Muir, V. J.; Lai, M. Y.; Trotter, N. S.; Callis, D. J., Synthesis of proline-modified analogues of the neuroprotective agent glycyl-L-prolyl-L-glutamic acid (GPE). *Tetrahedron* **2005**, *61* (42), 10018-10035.
62. De Diego, S. A. A.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; de Vega, M. J. P.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Martín-Martínez, M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Río, J.; Jimeno, M. L., The neuroprotective activity of GPE tripeptide analogues does not correlate with glutamate receptor binding affinity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2006**, *16* (13), 3396-3400.
63. De Diego, S. A. A.; Muñoz, P.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Martín-Martínez, M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Río, J.; Jimeno, M. L.; García-López, M. T., Analogues of the neuroprotective tripeptide Gly-Pro-Glu (GPE): synthesis and structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2005**, *15* (9), 2279-2283.
64. Lai, M. Y.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W.; Levi, M. S.; Sieg, F., Synthesis and pharmacological evaluation of glycine-modified analogues of the neuroprotective agent glycyl-L-prolyl-L-glutamic acid (GPE). *Bioorganic & medicinal chemistry* **2005**, *13* (2), 533-548.
65. Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J. M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L., Modulation of agonist binding to human dopamine receptor subtypes by L-prolyl-L-leucyl-glycinamide and a peptidomimetic analog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, *315* (3), 1228-1236.
66. Huidobro-Toro, J.; De Carolis, A. S.; Longo, V., Action of two hypothalamic factors (TRH, MIF) and of angiotensin II on the behavioral effects of L-DOPA and 5-hydroxytryptophan in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1974**, *2* (1), 105-109.

67. Mishra, R. K.; Makman, M. H.; Costain, W. J.; Nair, V. D.; Johnson, R. L., Modulation of agonist stimulated adenylyl cyclase and GTPase activity by l-pro-l-leu-glycinamide and its peptidomimetic analogue in rat striatal membranes. *Neuroscience letters* **1999**, 269 (1), 21-24.
68. Bhagwanth, S.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L., Development of peptidomimetic ligands of Pro-Leu-Gly-NH₂ as allosteric modulators of the dopamine D₂ receptor. *Beilstein journal of organic chemistry* **2013**, 9 (1), 204-214.
69. Ehrensing, R.; Kastin, A.; Larsons, P.; Bishop, G., Melanocyte-stimulating-hormone release-inhibiting factor-I and tardive dyskinesia. *Diseases of the nervous system* **1977**, 38 (4), 303-307.
70. Dolbeare, K.; Pontoriero, G. F.; Gupta, S. K.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L., Synthesis and dopamine receptor modulating activity of 3-substituted γ -lactam peptidomimetics of L-prolyl-L-leucyl-glycinamide. *Journal of medicinal chemistry* **2003**, 46 (5), 727-733.
71. Tararov, V. I.; Kadyrov, R.; Kadyrova, Z.; Dubrovina, N.; Börner, A., An improved synthesis of enantiopure 2-azabicyclo[2.2.1]heptane-3-carboxylic acid. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13 (1), 25-28.
72. Dirvianskytė, N.; Straukas, J.; Razumas, V.; Butkus, E., Synthesis and Fungicidal Activity of Lipophylic N-and O-Acyl Derivatives of β -Hydroxy D,L- α -Amino Acids. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2003**, 58 (5-6), 366-370.
73. Vogel, A. *Text Book of Practical Organic Chemistry*. 5th Edn., Longmann, New York; ISBN-0-582-46236-3: 1989.